

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



FERNANDA FERRARI

**“CARACTERIZAÇÃO CROMOSSÔMICA EM CANA-DE-
AÇÚCAR (*Saccharum* spp., Poaceae)”**

Este exemplar corresponde à rejeição
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Fernanda Ferrari
e aprovada pela Comissão

Elisiana Regina Forni Martins

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Mestre em Biologia Vegetal.

Orientadora: Profa. Dra. Elisiana Regina Forni Martins

Campinas, SP

2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

F412c Ferrari, Fernanda
Caracterização cromossômica em cana-de-açúcar
(*Saccharum* spp., Poaceae) / Fernanda Ferrari. –
Campinas, SP: [s.n.], 2010.

Orientadora: Eliana Regina Forni Martins.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Citogenética vegetal. 2. Cana-de-açúcar. 3.
Cromossomos vegetais. 4. Hibridização *in situ*
fluorescência. 5. Mapa citogenético. I. Martins, Eliana
Regina Forni. II. Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia. III. Título.

(rcdt/ib)

Título em inglês: Sugarcane chromosomal characterization (*Saccharum* spp., Poaceae).

Palavras-chave em inglês: Plant cytogenetics; Sugarcane; Plant chromosomes; Fluorescence
in situ hybridization; Cytogenetic map.

Área de concentração: Biologia Vegetal.

Titulação: Mestre em Biologia Vegetal.

Banca examinadora: Eliana Regina Forni Martins, Anete Pereira de Souza, Ricardo Augusto
Lombello.

Data da defesa: 22/01/2010.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Vegetal.

Campinas, 22 de janeiro de 2010

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Eliana Regina Forni Martins (Orientadora)



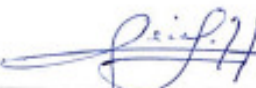
Assinatura

Profa. Dra. Anete Pereira de Souza



Assinatura

Prof. Dr. Ricardo Augusto Lombello



Assinatura

Prof. Dr. Walter Maccheroni Júnior

Assinatura

Profa. Dra. Ana Paula de Moraes

Assinatura

Aos meus pais Rubens e Selma, principais incentivadores de toda a minha formação profissional.

Ao meu filho Felipe, minha principal razão de viver e crescer.

“Quando morremos, nada pode ser levado conosco, com a exceção das sementes
lançadas por nosso trabalho e do nosso conhecimento.”

Dalai Lama

AGRADECIMENTOS

A Deus pela saúde e todas as conquistas alcançadas;

A meus pais, Rubens e Selma, que além de maiores incentivadores, me ensinaram grandes valores como honestidade, responsabilidade e persistência;

Ao meu pai Fausto, que mesmo de longe foi exemplo de humildade e bondade;

À Michelle, irmã querida, amiga e companheira;

Ao Nilson, pelo amor, essencial na construção diária de nossos sonhos;

Ao Felipe, filho amado, o grande incentivo para que eu seja uma pessoa melhor a cada dia;

Aos sobrinhos, Maria Eliza e seu irmãozinho(a);

À CanaVialis pela oportunidade;

Ao gestor e orientador, Walter Maccheroni, que idealizou o trabalho e concedeu a mim a oportunidade de realizá-lo;

À professora Eliana, minha orientadora, que permitiu com que todas as idéias fossem desenvolvidas dentro de uma pós-graduação e guiou meus primeiros passos na citogenética.

Aos amigos do Laboratório de Biossitemática, Itayaguara, Vanessa, Juan e Ana Paula, por todos os ensinamentos e ajudas concedidas.

Aos amigos do laboratório da CanaVilais, Rafaela, Eduardo, Rebeca, Michele, Flávia e Mariana. Aos mais novos, Alessandra, Jonas, Israel, Oseas, André, Aline, Juliana, Marilene. E aos que já seguiram outros caminhos, Guilherme, Cristiano e Silvia.

Às companheiras de equipe Daniela e Érica, que tanto me ajudaram nos últimos meses deste trabalho.

Aos amigos Hamilton e Almir, fontes de conhecimentos e conselheiros pessoais e profissionais;

Às amigas Thais Ferraz, Hellen, Thais Postali, Raquel e Roberta, que juntas dividem a profissão escolhida e me incentivam a ser uma bióloga cada vez melhor.

Aos gestores Marcos Alegria e Gustavo Monge, que dentre aos muitos que passaram deixaram grandes valores profissionais os quais guardarei para sempre.

A todos os outros amigos e familiares que estiveram por perto e de alguma maneira participaram da realização desse sonho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	3
LISTA DE TABELAS.....	7
RESUMO.....	9
ABSTRACT	11
1. INTRODUÇÃO	13
1.1 Aspectos econômicos da cultura de cana-de-açúcar no Brasil e no mundo	13
1.2 Taxonomia do gênero <i>Saccharum</i>	14
1.3 Origem genética e geográfica do gênero <i>Saccharum</i>	15
1.3.1 <i>Saccharum spontaneum</i> L.....	17
1.3.2 <i>Saccharum robustum</i> Brandes. e Jeswiet. ex Grassl.....	20
1.3.3 <i>Saccharum officinarum</i> L.	21
1.3.4 <i>Saccharum sinense</i> Roxb. e <i>Saccharum barberi</i> Jeswiet.	23
1.3.5 <i>Saccharum edule</i> Hassk.	24
1.4 Características botânicas de cana-de-açúcar	25
1.5 Origem genética das atuais variedades de cana-de-açúcar	31
1.6 Origem das atuais variedades de cana-de-açúcar cultivadas no Brasil.....	35
1.7 Importantes variedades de cana-de-açúcar atualmente cultivadas no Brasil	36
1.7.1 RB72454	36
1.7.2 RB835486	37
1.7.3 RB867515	37
1.8 Melhoramento genético de cana-de-açúcar.....	38
1.9 A citogenética no melhoramento de plantas	41
1.10 Estudos cromossômicos em cana-de-açúcar.....	43

2. OBJETIVOS.....	47
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	49
3.1 Obtenção do material vegetal	49
3.2 Pré-tratamento e fixação do material	49
3.3 Preparações mitóticas.....	50
3.4 Contagem dos números cromossômicos	50
3.5 Hibridizações <i>in situ</i> Fluorescente (FISH).....	53
3.5.1 Preparação da sonda rDNA 45S	53
3.5.2 Preparação da sonda rDNA 5S	54
3.5.3 Hibridização <i>in situ</i> fluorescente	56
3.6 Registros dos resultados.....	57
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
4.1 Obtenção dos colmos, enraizamento e preparações citológicas	59
4.2 Caracterização cromossômica das espécies <i>S. officinarum</i> e <i>S. spontaneum</i>	60
4.3 Caracterização cromossômica das atuais variedades de cana-de-açúcar	64
4.4 Caracterização dos sítios de DNA ribossomal 45S e 5S nas espécies e variedades híbridas de cana-de-açúcar.....	69
5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	79
6. BIBLIOGRAFIA.....	81

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa indicando a região da Indonésia como provável centro de origem da cana-de-açúcar (círculo rosa). As principais regiões de cultivo da cana-de-açúcar estão destacadas em cinza.....	16
Figura 2. Esquema ilustrando a provável história evolutiva da cana-de-açúcar..	17
Figura 3. Dois tipos de plantas selvagens de <i>S. spontaneum</i> . (a) Acesso “SES113A” com touceira de hábito ereto; (b) Acesso “Coimbatore” com touceira na forma de tufo (tipo “capim”)..	19
Figura 4. Acesso “NG28-289” de <i>S. robustum</i> em banco de germoplasma nos EUA.....	21
Figura 5. (a) Acessos de <i>S. officinarum</i> em um banco de germoplasma na Índia. (b) Colmos de diferentes acessos de <i>S. officinarum</i> representando a sua diversidade de cores e formas dos colmos.....	22
Figura 6. Acesso de <i>S. sinense</i> (a) e <i>S. barberi</i> (b) em banco de germoplasma na Índia.....	24
Figura 7. Colmo característico da variedade Co62197, com detalhe para o internódio e nódio. Note a alternância da posição das gemas entre internódios.....	26
Figura 8. Ilustração representando os tipos de nódios, internódios e gemas observados em <i>Saccharum</i> spp., classificados de acordo com a forma..	27
Figura 9. Folha característica de variedade Co86071, com detalhe para bainha, colar (composto de cotovelo, lígula e aurícula) e lâmina foliar..	28
Figura 10. Ilustração representando os tipos de lígulas, cotovelo e aurículas classificados de acordo com a forma..	29
Figura 11. A inflorescência da cana-de-açúcar. Variedades de cana-de-açúcar florescendo (a) com detalhe para a panícula em forma sagitada (b)..	30
Figura 12. Ilustração representando a formação de uma touceira de cana-de-açúcar com perfilhos formados a partir de brotos de gemas presentes no rizoma.....	31
Figura 13. Esquema mostrando os cruzamentos interespecíficos entre <i>S. officinarum</i> e <i>S. spontaneum</i> (a), formando progênie nobilitada em dois retrocruzamentos com <i>S. officinarum</i> (b, c e d) até a formação dos híbridos atuais de cana-de-açúcar.....	34

Figura 14. Esquema mostrando a organização cromossômica do genoma de uma variedade atual de cana-de-açúcar. Em verde estão representados os cromossomos provenientes de <i>S. officinarum</i> . Em vermelho estão representados os cromossomos provenientes de <i>S. spontaneum</i>	35
Figura 15. Vista aérea do banco de germoplasma da CanaVialis em Maceió, AL, no período de florescimento (abril a junho).....	39
Figura 16. (a) Campânulas utilizadas em cruzamentos biparentais contendo inflorescências de um único progenitor masculino e de um progenitor feminino. Nestas campânulas as flores dos progenitores masculinos são posicionadas acima das flores dos progenitores femininos, para que o pólen caia sobre as flores e fecunde os óvulos; (b) Campânula utilizada para policruzamento contendo várias panículas de diversos progenitores; (c) grupo de sementes obtidas de uma panícula proveniente de um progenitor feminino.....	40
Figura 17. Principais etapas da técnica de hibridização <i>in situ</i> . A marcação da sonda (a) é feita em paralelo à preparação da lâmina (b). Em seguida, a sonda e o DNA cromossômico são desnaturados (c, d) e, quando colocados em contato, a sonda hibridiza <i>in situ</i> (e) com o DNA-alvo. A marcação da sonda pode ser detectada por anticorpos ligados a fluocromos (f) e visualizada diferencialmente ao microscópio (g).	43
Figura 18. Cromossomos em pró-metáfase e metáfase mitótica da variedade de <i>Saccharum</i> spp. com diferentes qualidades de preparações. (a) Nota 1. (b) Nota 2. (c) Nota 3.....	52
Figura 19. Contagens cromossômicas obtidas para as espécies <i>S. spontaneum</i> e <i>S. officinarum</i>	62
Figura 20. Cromossomos em metáfase mitótica da espécie <i>Saccharum officinarum</i> ($2n = 80$) Barra = 10µm.....	62
Figura 21. Cromossomos em metáfase mitótica da espécie <i>Saccharum spontaneum</i> ($2n = 64$). Barra = 10µm.....	63
Figura 22. Cromossomos em pró-metáfase mitótica da variedade de <i>Saccharum</i> , RB72454 ($2n = 112$). Barra = 10µm.	65
Figura 23. Cromossomos em metáfase mitótica da variedade de <i>Saccharum</i> , RB835486 ($2n = 112$). Barra = 10µm.	65
Figura 24. Cromossomos em metáfase mitótica da variedade de <i>Saccharum</i> , RB867515 ($2n = 110$). Barra = 10µm.	66

- Figura 25.** Contagens cromossômicas obtidas para as variedades RB72454, RB835486 e RB867515..... 67
- Figura 26.** Sítios de rDNA em cromossomos de *S. officinarum* (2n = 80) com (a) sonda rDNA 45S marcada com FITC, 8 sítios e (b) sonda rDNA 5S marcada com rodamina, 8 sítios; e *S. spontaneum* (2n = 64) com (a) sonda rDNA 45S marcada com FITC, 8 sítios e (b) sonda rDNA 5S marcada com rodamina, 8 sítios. Os cromossomos foram contra-corados com (a e c) iodeto de propídeo e (b e d) DAPI. Todos os sítios estão indicados por setas. Barra = 10µm. 70
- Figura 27.** Sítios de rDNA em cromossomos da variedade de *Saccharum* spp., RB72454 (2n = 112) (a) sonda rDNA 45S marcada com FITC , 12 sítios e (b) sonda rDNA 5S marcada com rodamina, 12 sítios. Os cromossomos foram contra-corados com (a) iodeto de propídeo e (b) DAPI. Todos os sítios estão indicados por setas. Setas azuis indicam sítios intersticiais. Barra = 10µm..... 72
- Figura 28.** Sítios de rDNA em cromossomos da variedade de *Saccharum* spp., RB835486 (2n = 112) (a) sonda rDNA 45S marcada com FITC, 12 sítios e (b) sonda rDNA 5S marcada com rodamina, 12 sítios. Os cromossomos foram contra-corados com (a) iodeto de propídeo e (b) DAPI. Todos os sítios estão indicados por setas brancas. Barra = 10µm. 73
- Figura 29.** Sítios de rDNA em cromossomos da variedade de *Saccharum* spp., RB867515 (2n = 112) (a) sonda rDNA 45S marcada com FITC, 11 sítios e (b) sonda rDNA 5S marcada com rodamina, 9 sítios. Os cromossomos foram contra-corados com (a) iodeto de propídeo e (b) DAPI. Todos os sítios estão indicados por setas. Setas azuis indicam sítios intersticiais. Barra = 10µm..... 74
- Figura 30.** Alguns sítios de rDNA 45S marcados com FITC (verde) e sítios de rDNA 5S marcados com rodamina (vermelho) em metáfase mitótica de *Saccharum* spp. demonstrando a presença desses sítios em cromossomos diferentes. Os cromossomos foram contra-corados com DAPI. Os sítios são indicados em setas verdes (rDNA 45S) e vermelhas (rDNA 5S). Barra = 10µm..... 76
- Figura 31.** Esquema da organização cromossômica da variedade RB72454 baseada nos dados obtidos neste estudo. Em verde são ilustrados os cromossomos herdados de *S. officinarum*, em vermelho os cromossomos herdados de *S. spontaneum* e em laranja os cromossomos ainda não identificados. GH45 representa o grupo homeólogo que contém o *locus* 45S e GH5 representa o

grupo homó(eó)logo que contém o *locus* 5S. Os sítios rDNA 45S são ilustrados em amarelo e em azul os sítios de rDNA 5S. 77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Seqüência dos <i>primers</i> utilizados para amplificação do gene 5S em cana-de-açúcar. .	55
Tabela 2. Melhores pré-tratamentos estabelecidos para espécies e variedades de cana-de-açúcar em estudo.....	59
Tabela 3. Números cromossômicos em espécies e variedades de cana-de-açúcar.....	61
Tabela 4. Números cromossômicos descritos para variedades de cana-de-açúcar (<i>Saccharum</i> spp.).	69
Tabela 5. Números e características dos sítios rDNA 45S e 5S descritos para espécies e variedades de cana-de-açúcar.	71

RESUMO

A cana-de-açúcar assumiu grande importância no cenário econômico mundial, não só pela produção de açúcar, mas também de etanol. Variedades modernas de cana-de-açúcar são essencialmente derivadas de hibridações feitas no início do século XX entre duas espécies de *Saccharum*, *S. officinarum* ($2n = 80$) e *S. spontaneum* ($2n = 40-128$), seguidas de retrocruzamentos dos híbridos com *S. officinarum*. Devido à poliploidia natural do gênero e a aneuploidia das variedades híbridas o estudo citogenético em cana-de-açúcar é complexo. O advento da citogenética molecular, mediante a técnica de hibridização de DNA *in situ* (FISH e GISH), vem propiciando avanços no entendimento da organização genômica de *Saccharum* e de gêneros relacionados.

O objetivo deste trabalho foi realizar análises cromossômicas, de número e sítios de rDNA, nas duas principais espécies do gênero, *S. officinarum* e *S. spontaneum*, e em mais três importantes variedades brasileiras, RB72454, RB835486 e RB867515.

Foi possível confirmar as identidades das espécies *S. officinarum* ($2n = 80$) e *S. spontaneum* ($2n = 64$) mediante a contagem do número cromossômico. Foram caracterizados, pela primeira vez, os números cromossômicos das variedades RB72454 e RB835486 ($2n = 112$) e na RB867515 ($2n = 110$). Através de técnicas de hibridização *in situ* fluorescente foram quantificados os sítios de rDNA 45S e 5S. As espécies *S. officinarum* e *S. spontaneum*, conforme já descrito na literatura, apresentaram 8 sítios de cada *locus*. As variedades RB72454 e RB835486 apresentaram 12 sítios de cada *locus* e a variedade RB867515 apresentou 11 sítios do rDNA 45S e 9 sítios do rDNA 5S. Os *loci* de rDNA 45S e 5S encontram-se em grupos homó(eó)logos distintos e por isso, esses dois genes caracterizam-se dois marcadores cromossômicos em *Saccharum* spp. A localização do *locus* de rDNA 45S em posição distinta nos cromossomos de *S. officinarum* (terminais) e *S. spontaneum* (intersticiais), possibilitou a quantificação da contribuição dessas espécies, no respectivo grupo homeólogo, para as variedades RB72454 e RB867515.

Palavras-chaves: Citogenética, cana-de-açúcar, cromossomos, hibridização *in situ* fluorescente, mapa citogenético.

ABSTRACT

Sugarcane has assumed an eminent position in the world economical scenario, not only for sugar, but also for ethanol production. Current sugarcane varieties are hybrids from initial interspecific crosses involving mainly two species of *Saccharum*, *S. officinarum* ($2n = 80$) and *S. spontaneum* ($2n = 40-128$), followed by backcrossing with *S. officinarum*. Due to the polyploidy nature of the genus *Saccharum* and the aneuploidy occurring in the interspecific hybrids, the cytogenetic study of sugarcane is complex. Moreover, chromosomes are small and morphologically similar. The molecular cytogenetics, with technique of DNA *in situ* hybridization (GISH and FISH), has provided advances in the understanding of genomic organization of this crop.

The goal of this study was to realize chromosomal analysis, including chromosome number and sites of rDNA of two species, *S. officinarum* and *S. spontaneum*, and of three Brazilian varieties, RB72454, RB835486 and RB867515.

The identities of the species *S. officinarum* ($2n = 80$) and *S. spontaneum* ($2n = 64$) were confirmed counting their chromosome numbers. We also counted the chromosome numbers of the varieties RB72454 and RB835486 ($2n = 112$) and RB867515 ($2n = 110$). Using FISH techniques, we could quantify the rDNA 45S and 5S sites of all the accesses. *S. officinarum* and *S. spontaneum*, as described in the literature, had 8 sites at each *locus*. For the varieties RB72454 and RB835486, 12 sites at each *locus* were detected and for RB867515, 11 sites of rDNA 45S and 9 sites of rDNA 5S were detected. The *loci* rDNA 45S and 5S are in different homo(eo)logues groups being thus characterized as two chromosomal markers for *Saccharum* spp. Since the rDNA 45S is located in different positions in *S. officinarum* (terminals) and *S. spontaneum* (interstitial), this marker could be applied in the quantification, in this homeologue group, of the chromosome numbers inherited from *S. officinarum* and *S. spontaneum* by the varieties RB72454, RB867515.

Keywords: Cytogenetics, sugarcane, chromosomes, fluorescent *in situ* hybridization, cytogenetic map.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos econômicos da cultura de cana-de-açúcar no Brasil e no mundo

A cana-de-açúcar é responsável por 75% e 30% da produção mundial de açúcar e etanol (Ming *et al.*, 2006).

O Brasil é o maior produtor mundial de açúcar (18%), com domínio de 70% do atual comércio internacional (Licht, 2008). Da safra de 1990/1991 até a safra de 2007/2008 a produção brasileira de açúcar avançou de 7.365.344 para 30.760.165 toneladas (UNICA, 2008). Esse número representa um crescimento de aproximadamente 400% no período e significa ao país hegemonia no comércio internacional, com grandes perspectivas de ampliar essa participação caso haja retirada de subsídios praticados pela União Européia para a produção de açúcar (UNICA, 2005).

Da fermentação do açúcar pode-se obter o álcool, sendo este uma das principais alternativas energética no mundo, principalmente por conta do agravamento da degradação ambiental pelo homem, dos perigos iminentes do aquecimento global e dos preços instáveis e elevados do petróleo (Ortolan, 2006).

EUA e Brasil são os maiores produtores de etanol do mundo, responsáveis por 42% e 37% da produção mundial, respectivamente (UNICA, 2008). Embora os EUA tenham atualmente a maior produção de etanol do mundo, ela é baseada no uso do milho como matéria-prima. Em comparação com a cana-de-açúcar, o milho possui um menor rendimento na produção de etanol (aproximadamente 4.000 litros por hectare), além de afetar a disponibilidade de alimentos e de ração animal (English *et al.*, 2005). Com rendimento médio de 7.500 litros de etanol por hectare, a cana-de-açúcar é a melhor opção atualmente para produção deste biocombustível (Moreira, 2000).

De acordo com a União da Indústria de Cana-de-açúcar (UNICA, 2009), a exportação brasileira de etanol durante a safra 2008/2009, em volume, aumentou 30% em relação à safra anterior 2007/2008, atingindo quase 5 bilhões de litros (4.721,9 milhões de litros). Esse número representa um aumento na exportação de aproximadamente 500% desde a safra 2003/2004. Esta

crescente demanda é resultado tanto da promoção do uso de biocombustíveis de fontes renováveis, quanto das políticas de redução da dependência do petróleo proveniente de áreas de instabilidade política e da volatilidade de seus preços, exigindo produção de álcool combustível para os próximos 10 anos estimado em volumes superiores a 200 bilhões de litros anuais (Annual Energy Outlook, 2008).

Nos últimos anos, grupos de pesquisa (públicos e privados) ao redor do mundo estão investindo no estabelecimento de tecnologias para a conversão do bagaço da cana-de-açúcar em açúcares fermentáveis, para produção de mais etanol (Demirbas, 2001). Embora ainda não possa ser aplicada em escala industrial, este tipo de tecnologia tem grande importância nesse contexto de crescente demanda (Badger, 2002). Por todos esses motivos o álcool produzido da cana-de-açúcar é o principal propulsor do setor sucroalcooleiro e atualmente movimenta grandes montantes de investimentos (Boyle *et al.*, 2008).

1.2 Taxonomia do gênero *Saccharum*

A cana-de-açúcar pertence ao gênero *Saccharum* (referência em latim ao açúcar), família Poaceae e foi descrita taxonomicamente pela primeira vez por Linnaeus em 1753 no livro “Species Plantarum” (Hitchcock, 1923). Em seu livro, Linnaeus constituiu o gênero *Saccharum* com duas espécies: *S. officinarum* L. e *S. spicatum* L.. *S. spicatum* foi posteriormente transferido para o gênero *Perotis* (*P. spicata* (L.) T. Durand e H. Durand (Dillon *et al.*, 2007).

Após a inclusão de dezenas de espécies dentro do gênero *Saccharum*, em 1889, Eduard Hackel incluiu à classificação de Linnaeus quatro seções como subdivisões do gênero *Saccharum*: *EuSaccharum* (composta por seis espécies: *S. officinarum* L., *S. robustum* Brandes e Jeswiet. ex Grassl, *S. arundinaceum* Retz., *S. ciliare* Andersson, *S. narenga* (Nees ex Steud.) Wall. ex Hack. e *S. porphyrocoma* (Hance ex Trimen) Hack.), *Sclerostachya*, *Eriochrpsis* e *Leptosacharum* (Rao, 1987).

Em revisão às classificações anteriores, Dutt e Rao em 1950, sugeriram a composição do gênero *Saccharum* com cinco espécies: *S. officinarum*, *S. spontaneum*, *S. barberi* (que incluía os grupos Mungo, Sareth, Sunnabile e Nargori descritos por Barber), *S. sinense* (que incluía o

grupo Pansashi) e *S. robustum*. Outras espécies que estavam descritas como plantas do gênero *Saccharum* foram re-classificadas nas cinco espécies citadas ou em outros novos gêneros (*Erianthus*, *Narenga* e *Sclerostachya*) (Grassl, 1964). Esta nova caracterização foi bem aceita, principalmente após os trabalhos de Mukherjee em 1957, mostrando a relação filogenética dos gêneros *Saccharum*, *Erianthus* seção *Ripidium*, *Sclerostachya* e *Narenga*, criando a expressão “Complexo *Saccharum*” para o grupo dos gêneros citados e descrevendo a capacidade destas espécies em realizar hibridações entre si. Posteriormente, o gênero *Miscanthus* seção *Diandra* foi incluído a este grupo (Daniels *et al.*, 1975).

Após todas as revisões taxonômicas citadas que ocorreram principalmente durante o século XX, atualmente a organização taxonômica mais utilizada (ou aceita) descreve a cana-de-açúcar como membro da família Poaceae, sub-família Panicoideae, tribo Andropogoneae; Sub-tribo Saccharinae, grupo Saccharastrae e gênero *Saccharum* (Daniels e Roach, 1987). Ao gênero *Saccharum* incluem-se seis espécies: *S. officinarum*, *S. spontaneum*, *S. robustum*, *S. sinense*, *S. barberi* e *S. edule*. O “Complexo *Saccharum*” é constituído pelas espécies que compõem o gênero *Saccharum* juntamente com gêneros relacionados filogeneticamente (*Erianthus* seção *Ripidium*; *Sclerostachya*; *Narenga*; e *Miscanthus* seção *Diandra*). As atuais variedades de cana-de-açúcar são híbridos originados de cruzamentos interespecíficos feitos no início do século XX envolvendo principalmente plantas de *S. officinarum* e *S. spontaneum*. Estes híbridos são citados como *Saccharum* spp. (Landell e Bressiani, 2008).

1.3 Origem genética e geográfica do gênero *Saccharum*

O centro de origem do gênero *Saccharum* tem sido reportado por diversos autores, porém existem incertezas sobre a determinação exata desse local. A Índia, Indonésia, Papua Nova Guiné, China e ilhas da Polinésia, Fiji e Salomão estão entre as regiões mais citadas. Embora existam divergências em relação aos países, acredita-se que a cana-de-açúcar seja nativa do sudeste da Ásia (figura 1) (Mukherjee, 1957).

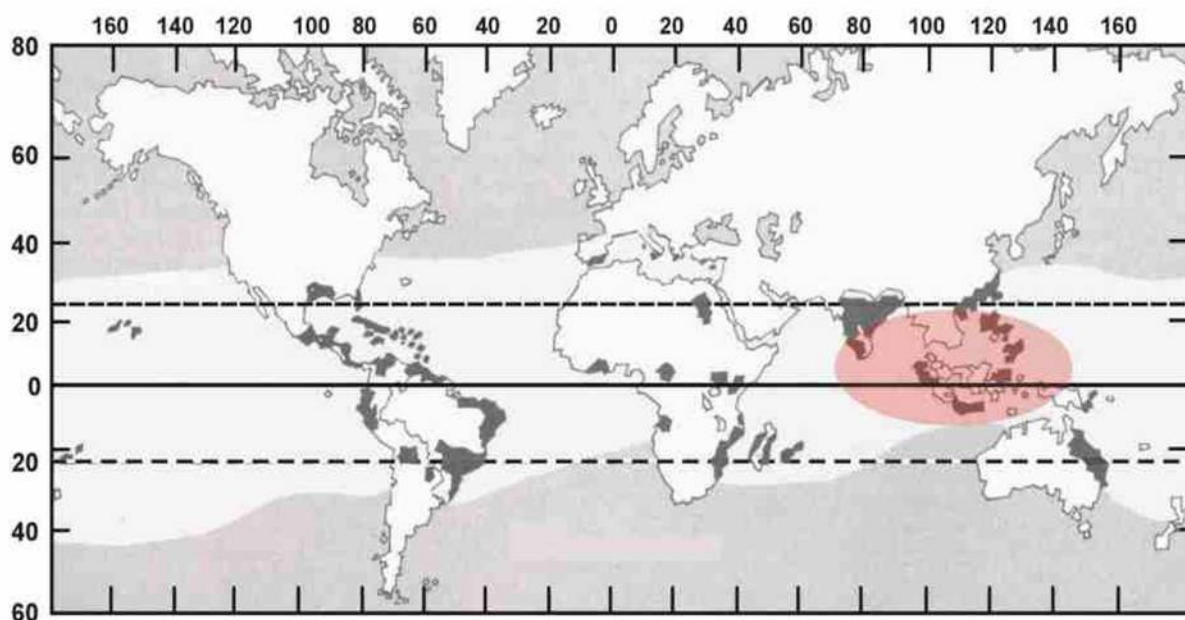


Figura 1. Mapa indicando a região da Indonésia como provável centro de origem da cana-de-açúcar (círculo rosa). As principais regiões de cultivo da cana-de-açúcar estão destacadas em cinza. Fonte: Ometto, 1981.

A hipótese de um ancestral comum para os gêneros do “Complexo *Saccharum*”, incluindo *Saccharum*, é tida como a mais provável (Barber, 1920). Estudos em citogenética para avaliação de progênies de cruzamentos realizados de plantas de *S. officinarum* e *Sclerostachya* (plantas que possuem número cromossômico básico $x = 10$) mostram que cinco dos dez cromossomos básicos existentes nas duas espécies são comuns, sugerindo a existência de um único ancestral de número cromossômico básico de $x = 5$ (Parthasarathy, 1948). Trabalhos semelhantes realizados na progênie gerada de cruzamentos intergenéricos envolvendo *Saccharum*, *Sclerostachya* e *Narenga* também sugerem a presença de um ancestral comum de número cromossômico básico $x = 5$ (Raghavan e Govindasamy, 1956).

Acredita-se que plantas de *S. officinarum* e *S. edule* surgiram a partir da seleção natural de populações selvagens de *S. robustum*, e que *S. barberi* e *S. sinense* são espécies derivadas da hibridação natural de *S. officinarum* e *S. spontaneum*. Conforme mencionado anteriormente, variedades modernas surgiram principalmente da hibridação das espécies *S. officinarum* e *S. spontaneum* realizada pelos primeiros programas de melhoramento de cana-de-açúcar (Landell e Bressiani, 2008).

A figura 2 representa esquematicamente a provável origem e evolução das espécies de *Saccharum* e das variedades híbridas atuais.

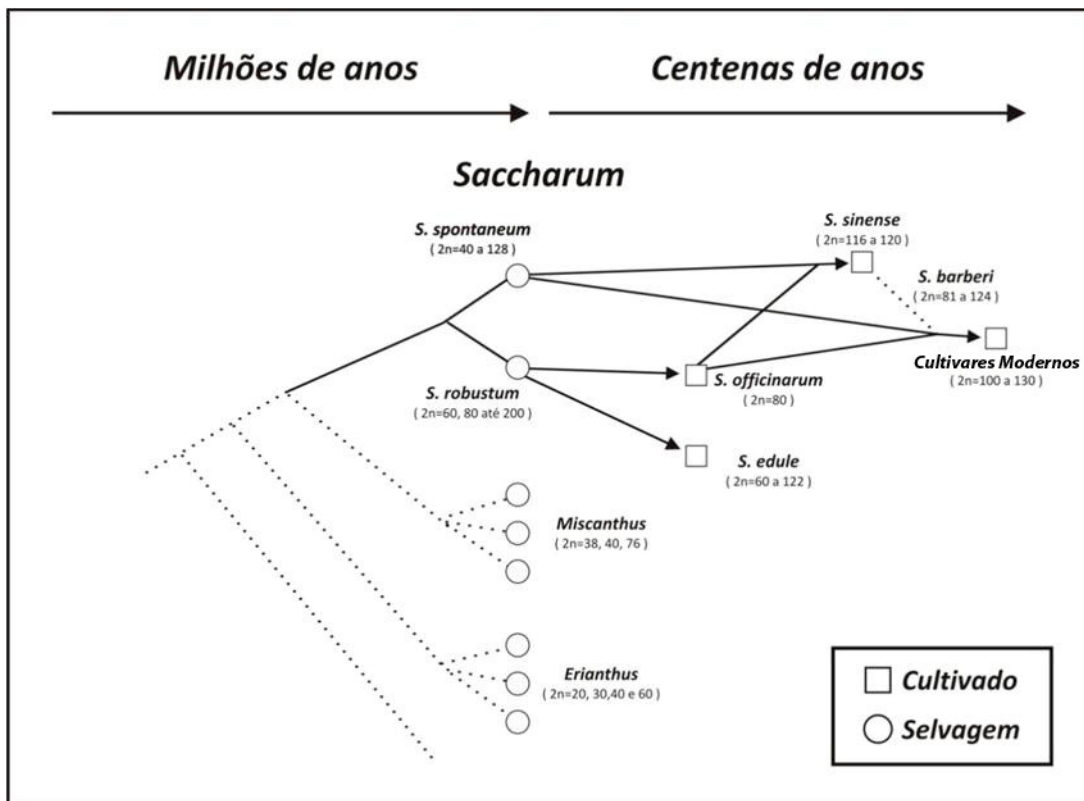


Figura 2. Esquema ilustrando a provável história evolutiva da cana-de-açúcar. Fonte: modificado de Grivet *et al.*, 2006.

1.3.1 *Saccharum spontaneum* L.

S. spontaneum é descrita como uma espécie complexa e altamente polimórfica. A variabilidade entre as plantas desta espécie é tão grande que somente na Índia, um dos principais centros de diversidade, já são conhecidos mais de 300 tipos. Plantas de *S. spontaneum* estão distribuídas desde o Japão e Indonésia/Papua-Nova Guiné até o Mediterrâneo e África, 8° S a 40° N a partir da linha do Equador. Formas desta espécie já foram coletadas em mais de 30 países (Argélia, Birmânia, Bangladesh, China, Congo, Egito, Ilha de Fiji, Índia, Indonésia, Iraque, Israel, Japão, Quênia, Malásia Cingapura, Ilhas Maurícius, Micronésia, Nova Guiné, Nepal, Nigéria, Paquistão, Filipinas, Itália (Sicília), Sri Lanka, Sudão, Tanzânia, Tailândia, Turquia,

Turquemenistão, Uganda e Rússia) (Rao, 1987). A espécie *S. spontaneum* apresenta duas subespécies: *indicum* e *aegiptiacum* (Pange, 1933).

A espécie possui citótipos com número cromossômico diplóide ($2n$) variando de 40 a 128 com $x=8$ (ou seja, todos os indivíduos que compõem a espécie são de origem poliplóide, podendo ser classificados de pentaplóides (cinco cópias de cada um dos oito cromossomos) até hexadecaplóides (dezesseis cópias de cada um dos oito cromossomos). Plantas de *S. spontaneum* com $2n=40$ são encontradas na região norte da Índia e há hipóteses de sua origem ter ocorrido a partir da hibridação natural de plantas de *Sclerostachya* e *Erianthus* seção *Ripidium* (Rao e Babu, 1955).

Plantas de *S. spontaneum* apresentam alta adaptabilidade, podendo ser encontradas em diversos ambientes (desertos, baixadas encharcadas, rochas, regiões litorâneas etc), altitudes (do nível do mar às montanhas do Himalaia) e condições climáticas (de regiões de clima tropical a locais de inverno nevado) (Pange e Srinivasan, 1957).

Morfologicamente as plantas podem se desenvolver em pequenas touceiras em forma de tufo (tipo “capim”) com ou sem colmos ou em touceiras de hábito ereto com colmos de até 2,5 m de altura e diâmetro entre 5 a 13 mm (figura 3).



Figura 3. Dois tipos de plantas selvagens de *S. spontaneum*. (a) Acesso “SES113A” de *S. spontaneum* com touceira de hábito ereto; (b) Acesso “Coimbatore” de *S. spontaneum* com touceira na forma de tufo (tipo “capim”). Foto (a): Kandasami e Sreenivasan, 1983; (b): Sizuo Matsuoka, 2005.

Os colmos são ricos em fibras e são pobres no conteúdo de sacarose. Os internódios dos colmos são normalmente longos e os nós são sempre mais estreitos que os internódios. As cores dos colmos variam em tonalidade de amarelo a verde, de acordo com a planta e/ou estágio de desenvolvimento. As folhas variam de quase ausência de limbo, com apenas a nervura central, até limbos de 4 centímetros (cm) de largura. Em geral, são plantas de grande perfilhamento e possuem um rizoma vigoroso que se alastra no solo de modo bastante invasivo.

Por toda esta imensa variabilidade, a espécie *S. spontaneum* é a que mais contribuiu com características de interesse agrônomo (vigor, dureza, perfilhamento, capacidade de rebrota de soqueira, resistência a estresse hídrico e a salinidade, doenças e pragas) aos programas de melhoramento genético (Naidu e Sreenivasan, 1987), além de ser uma das principais fontes de fibra em programas de melhoramento genético que visam o desenvolvimento de variedades com grande potencial para a produção de biomassa (Roach, 1977).

Dentre os seus numerosos citótipos destaca-se o citótipo Coimbatore ($2n=64$). Os citótipos Coimbatore e Java ($2n=112$) estão presentes na base genealógica de todas as variedades modernas de cana-de-açúcar (Peixoto, 1988). Barber, em 1921, cruzou a cana nobre Vellai (*S.*

officinarum) com uma *S. spontaneum* local, com 64 cromossomos, denominada *S. spontaneum* Coimbatore (Roach e Daniels, 1987).

1.3.2 *Saccharum robustum* Brandes. e Jeswiet. ex Grassl.

O provável centro de origem e diversidade dessa espécie é a região de Nova Guiné. Uma das hipóteses para a sua origem é a de que surgiu a partir de hibridações naturais de *S. spontaneum* ($2n=80$) com outros gêneros (possivelmente *Erianthus* e *Miscanthus*) (Daniels *et al.*, 1975).

Em 1963, Price reconheceu cinco grupos de híbridos para *S. robustum*, nos quais três deles apresentaram número cromossômico $2n=60$ e os outros dois $2n=80$. Posteriormente foi relatado um sexto grupo, com $2n=114-200$ (Price, 1965).

Morfologicamente as plantas de *S. robustum* são extremamente vigorosas formando touceiras densas com colmos que podem chegar a 10 m de altura e diâmetro de 20 a 45 mm. As folhas são freqüentemente largas. Assim como em *S. spontaneum*, as plantas de *S. robustum* possuem colmos ricos em fibras e pouca sacarose (figura 4). São freqüentemente descritas como susceptíveis ao vírus do mosaico da cana-de-açúcar (Stevenson, 1965 apud James, 2004). Embora haja interesse potencial na utilização desta espécie em programas de melhoramento genético por conta do seu grande vigor, há poucas citações da utilização da espécie, exceto nos híbridos produzidos pelo programa de melhoramento no Havaí (Naidu e Sreenivasan, 1987; Roach e Daniels, 1987).



Figura 4. Acesso “NG28-289” de *S. robustum* em banco de germoplasma nos EUA. Foto: Walter Maccheroni, 2005.

1.3.3 *Saccharum officinarum* L.

Diferentemente das espécies *S. spontaneum* e *S. robustum*, a espécie *S. officinarum* não é conhecida no estado selvagem. Embora o centro de origem não seja exatamente conhecido, Brandes (1956) sugere Nova Guiné como o principal centro de diversidade. Dessa região a espécie teria migrado para a região das Ilhas Salomão (8000 a.C.), após isso mais para o oeste para a Indonésia, Filipinas, Malásia (6000 a.C.) e por último migrado para leste na região da Ilha de Fiji, Tonga e Samoa indo até o Havaí (600 a 1000 d.C.) (Brandes, 1956 apud James, 2004).

A espécie possui número cromossômico $2n=80$, com $x=10$ (ou seja, todos os indivíduos que compõem a espécie são de origens poliplóides, sendo classificados como octaplóides, o que significa ter oito cópias de cada um dos dez cromossomos). É a única espécie dentro do gênero *Saccharum* em que o número cromossômico não é variável entre os indivíduos (Price, 1963).

É conhecida como “cana nobre”, por chamar a atenção pelos seus colmos largos (diâmetro variando de 14 a 46 mm), suculentos, doces (com porcentagem de sacarose entre 7-22%) e diversidade de cores (figura 5). Geralmente apresenta folhas largas, com limbos de 5 a 7 cm de largura e touceiras com poucos perfilhos.



Figura 5. (a) Acessos de *S. officinarum* em um banco de germoplasma na Índia. (b) Colmos de diferentes acessos de *S. officinarum* representando a sua diversidade de cores e formas dos colmos. Foto (a): Walter Maccheroni, 2005; (b): Sreenivasan e Nair, 1991.

S. officinarum foi a espécie predominantemente cultivada no mundo até o início do século XX. No Brasil a espécie foi introduzida durante o período da colonização por Martim Afonso de Souza em 1532, através de mudas trazidas da Ilha da Madeira, dando início ao ciclo do açúcar no Brasil (Figueiredo, 2008).

Enquanto a espécie foi cultivada, variedades de *S. officinarum* foram selecionadas de acordo com sua produtividade. A primeira variedade que se tornou conhecida e plantada em escala mundial foi a variedade “Creoula”, que mais tarde foi considerada um híbrido natural entre

S. barberi x *S. officinarum*. Em seguida, surgiu outra variedade denominada de “Otaheite” e que foi disseminada pelo mundo, recebendo diferentes nomes de acordo com a região em que foi cultivada, tais como, Bourbon, Lahaina e Vellai. No Brasil a variedade Caiana, introduzida em Pernambuco pelos holandeses, destacou-se e foi durante quase 70 anos (1810-1880) a principal variedade introduzida e reconhecida em substituição à Creoula (Figueredo, 2008). Desde as primeiras décadas do século XX essas variedades deixaram de ser cultivada extensivamente no mundo por susceptibilidade a diversas doenças. Por isso tornou-se a espécie base nos programas de melhoramento genético, juntamente com *S. spontaneum*, para a formação das atuais variedades de cana-de-açúcar. *S. officinarum* contribuiu principalmente como fonte genética para produção de sacarose, além de outras características importantes, tais como colmos suculentos, boa pureza do caldo e teor de fibra adequado para moagem (Naidu e Sreenivasan, 1987).

1.3.4 *Saccharum sinense* Roxb. e *Saccharum barberi* Jeswiet.

Por se tratarem de espécies de morfologia parecida e provável origem genética comum, as duas espécies serão descritas em um único tópico.

Embora não haja definição segura sobre a origem geográfica destas espécies, tem-se como hipótese mais provável a China e o norte da Índia como seus centros de origem (Daniels e Roach, 1987).

Trabalhos em citogenética mostram que tanto *S. sinense*, conhecida com “cana da China”, quanto *S. barberi* surgiram da hibridação natural de *S. officinarum* com *S. spontaneum*. *S. sinense* possui número cromossômico $2n = 116-120$ e *S. barberi* $2n = 81-124$ (D’Hont *et al.*, 2002).

Assim como *S. officinarum*, as espécies *S. sinense* e *S. barberi* foram espécies cultivadas. *S. barberi* foi cultivada de modo mais restrito no norte da Índia, possivelmente por ser adaptada e originária daquela região. *S. sinense* foi cultivada em algumas regiões do mundo, como Brasil (por volta de 1860), Ilhas Maurício (por volta de 1870), EUA e Porto Rico (por volta de 1915). Há citações indicando tolerância ao vírus do mosaico da cana-de-açúcar em *S. sinense*, justificando a disseminação da espécie da China para as outras regiões citadas (Earle, 1919 apud James, 2004).

Apresentam colmos finos a médios e, hoje, não possui grande interesse no melhoramento atual, principalmente devido à dificuldade de florescimento e à esterilidade. A figura 6 apresenta fotos de acessos das duas espécies citadas.



Figura 6. Acesso de *S. sinense* (a) e *S. barberi* (b) em banco de germoplasma na Índia. Foto (a e b): Walter Maccheroni, 2005.

1.3.5 *Saccharum edule* Hassk.

Possui centro de origem na região de Nova Guiné e ilha de Fiji e é frequentemente citada como produto de hibridação de *S. officinarum* ou *S. robustum* com outro gênero (possivelmente *Miscanthus*). Seus citótipos mais frequentes possuem número cromossômico $2n=60$, 70 ou 80, mas já foram relatados citótipos com até 122 cromossomos (Rao, 1987).

É uma espécie incomum que tem como principal característica a formação de inflorescências abortivas. Dessa forma, não há participação de *S. edule* em programas de melhoramento. Nas regiões citadas como centro de origem, a espécie é cultivada por nativos que utilizam sua inflorescência abortiva (de forma compacta) na alimentação (James, 2004).

1.4 Características botânicas de cana-de-açúcar

O estudo de caracteres morfológicos da cana-de-açúcar se desenvolveu durante a fase de revisão taxonômica (essencialmente durante o século XX) e o principal trabalho neste assunto é do botânico Dillewijn, com o livro “Botany of Sugarcane” publicado em 1952 (Scarpari e Beauclair, 2008).

Espécies de cana-de-açúcar são perenes na sua forma natural e semiperenes na forma cultivada, pois exigem novos plantios após algumas colheitas (o número de colheitas depende do local e do manejo utilizado para o cultivo)(Sizuo Matsuoka, comunicação pessoal). Geralmente as espécies e variedades de *Saccharum* possuem porte grande e sempre se desenvolvem na forma de touceiras. A parte aérea da planta é formada por colmos (com exceção de algumas plantas de *S. spontaneum*), folhas e inflorescências. A parte subterrânea é formada por raízes e rizomas.

Os colmos são cilíndricos e formados por sucessivos internódios (ou “entrenós”) ligados entre si pelos nódios (ou “nós”). Cada nódio possui uma gema axilar que se dispõe de maneira alternada entre cada internódio. Estas gemas axilares são utilizadas no cultivo extensivo para propagação das plantas, e por isso a cana-de-açúcar é freqüentemente descrita como uma cultura de propagação vegetativa (figura 7).

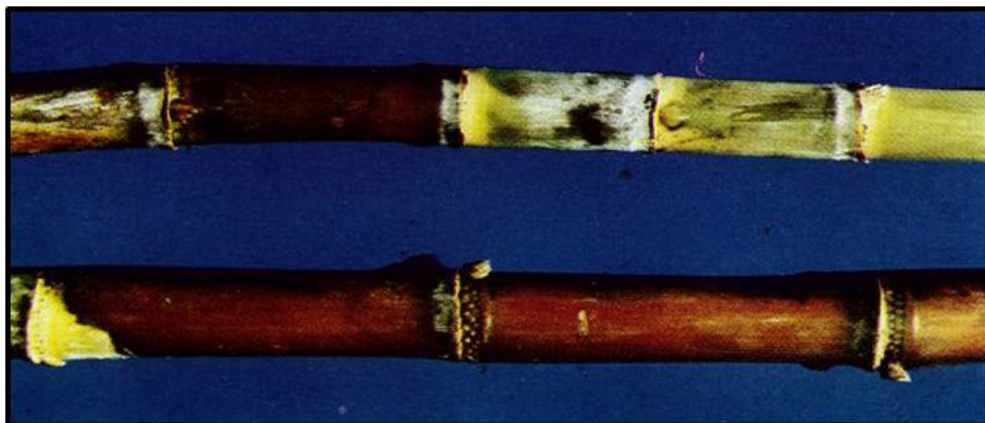


Figura 7. Colmo característico da variedade Co62197, com detalhe para o internódio e nódio. Note a alternância da posição das gemas entre internódios. Foto: Subramanian, 1987.

Apenas na natureza ou para fins de melhoramento genético a cana-de-açúcar é propagada por semente. Internódios, nódios e gemas que compõem um colmo possuem diversidade de cor, tamanho e forma, variando entre espécies e variedades (figura 8).

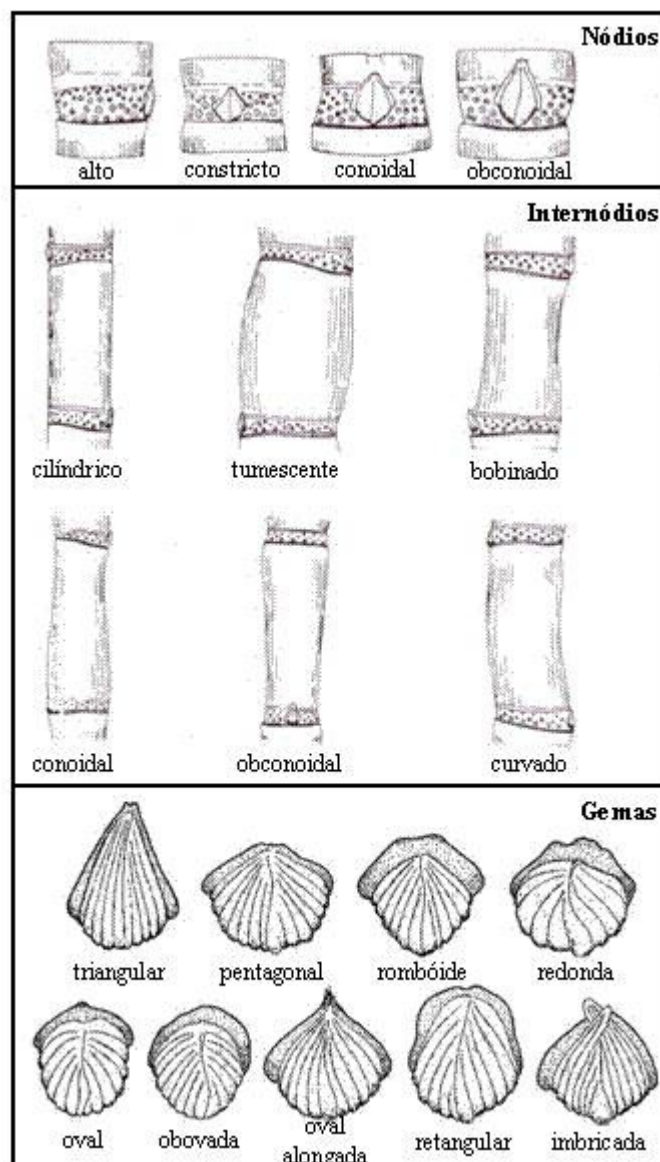


Figura 8. Ilustração representando os tipos de nódios, internódios e gemas observados em *Saccharum* spp., classificados de acordo com a forma. Fonte: Artschwager e Brandes, 1958 apud James, 2004.

As folhas estão fixadas à base dos nós e divididas em duas partes: bainha e lâmina foliar. A bainha é a uma região da folha de formato tubular que envolve o colmo e liga a lâmina foliar ao nódio (no colmo). A lâmina foliar é a região sustentada pela nervura central que se projeta a partir da bainha na forma alongada e plana. A lâmina foliar pode se manter ereta até o topo, dobrada ou curva próximo ao topo ou curvada em sua altura média. A bainha pode apresentar coloração diferente da lâmina foliar, além da presença de pêlos (denominados de joçal) e cera. O

ponto de ligação entre a bainha e a lâmina foliar é chamado de colar. O colar é dividido em três partes: cotovelo, lígula e aurícula. A figura 9 apresenta em detalhe a bainha, colar e lâmina foliar.

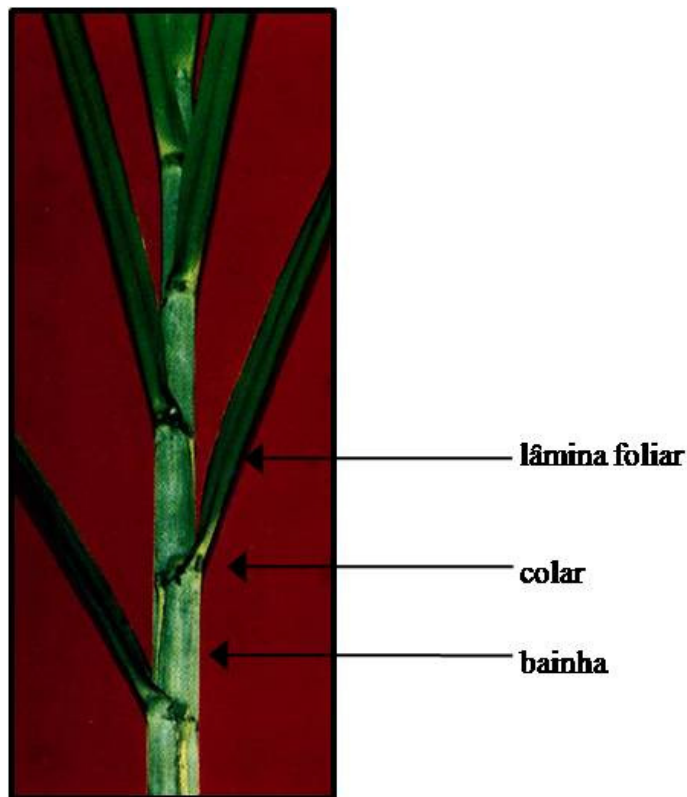


Figura 9. Folha característica de variedade Co86071, com detalhe para bainha, colar (composto de cotovelo, lígula e aurícula) e lâmina foliar. Foto: Adaptada de Subramanian, 1987.

Entre espécies e híbridos há diversidade de cores, tamanhos e formas para todos os componentes do colar (figura 10).

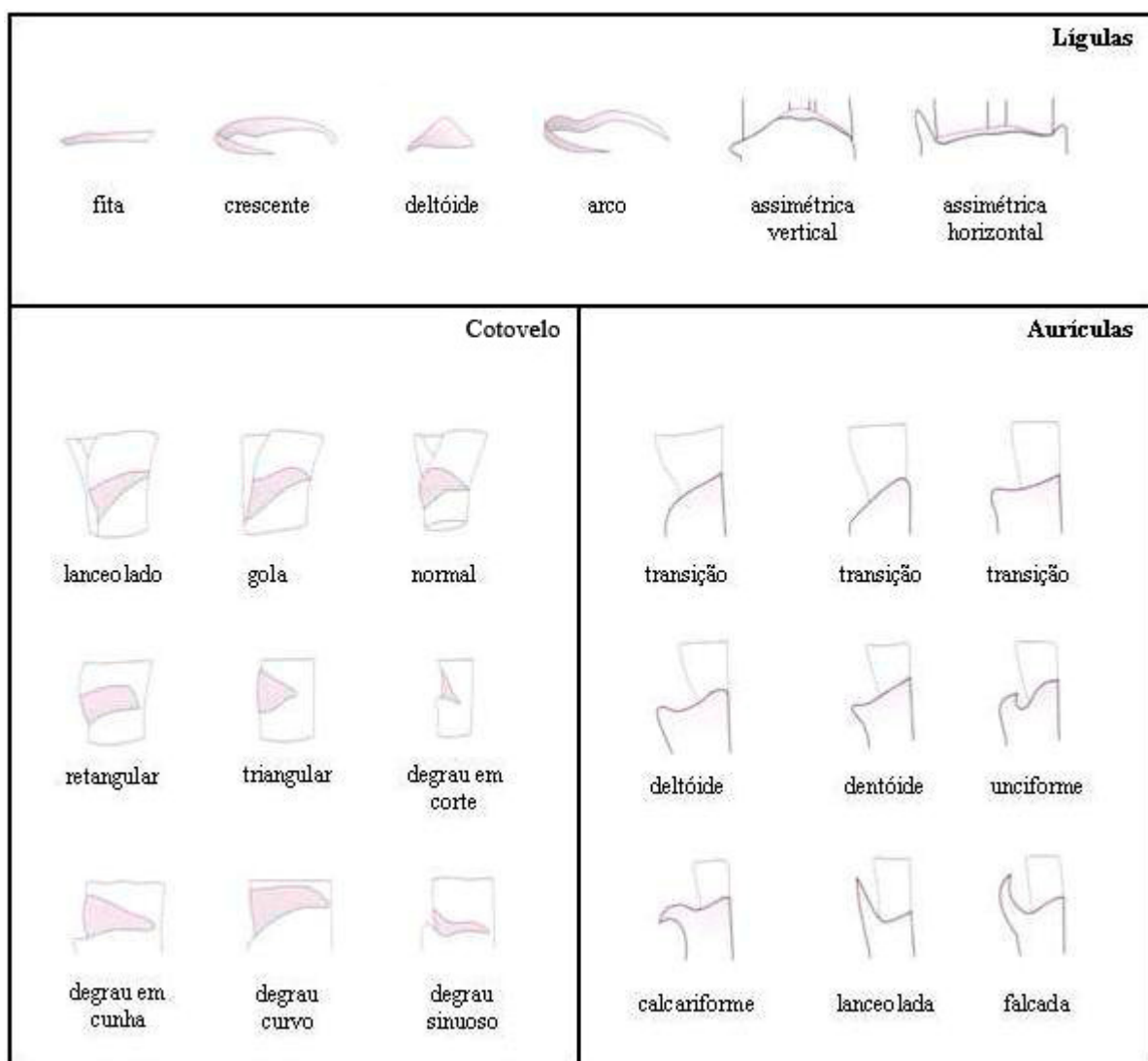


Figura 10. Ilustração representando os tipos de lígulas, cotovelo e aurículas classificados de acordo com a forma. Fonte: Artschwager e Brandes, 1958 apud James, 2004.

A inflorescência da cana-de-açúcar é do tipo panícula aberta em forma sagitada (figura 11). As flores que compõem a inflorescência são muito pequenas. Uma panícula de cana-de-açúcar possui centenas a milhares de flores e cada colmo pode gerar uma panícula. A flor é hermafrodita podendo ocorrer autofecundação, embora seja rara. O androceu é constituído por três estames, portando uma antera cada um. Uma mesma variedade ou planta pode ser utilizada em cruzamentos como progenitor masculino e/ou feminino (Van Dillewijn, 1952).



Figura 11. A inflorescência da cana-de-açúcar. Variedades de cana-de-açúcar florescendo (a) com detalhe para a panícula em forma sagitada (b). Foto: Hamilton Jordão, 2009.

As raízes da cana-de-açúcar são do tipo fasciculado e podem ser de dois tipos: raízes adventícias (para absorção de água no estágio inicial de brotação das gemas) e permanentes (para absorção de água das camadas mais profundas, sobretudo no período da seca e sustentação da touceira já formada) (Mongelard, 1968; Thompson, 1976).

Rizomas são caules subterrâneos, espessados, ricos em reservas e de crescimento horizontal. Assim como nos colmos, os rizomas são constituídos de internódios, nódios e gemas capazes de brotar e formar novos colmos. Os colmos derivados das gemas do rizoma são chamados de perfilhos. Cada perfilho comporta-se de modo independente, porém todos possuem ligação entre si, constituindo a touceira. Os primeiros brotos formarão colmos (perfilho primário), com gemas que formarão novos colmos (perfilho secundário). As gemas deste novo colmo formarão novos colmos (perfilho terciário), assim sucessivamente e constituindo a touceira (figura 12). Na espécie *S. spontaneum*, o crescimento lateral destes rizomas é bastante vigoroso, fazendo com que a planta produza muitos perfilhos e seja bastante invasiva. Nas demais espécies de *Saccharum* e nas variedades híbridas este crescimento horizontal é menos vigoroso e as touceiras formadas são mais compactas (sendo pouco ou não invasivas).

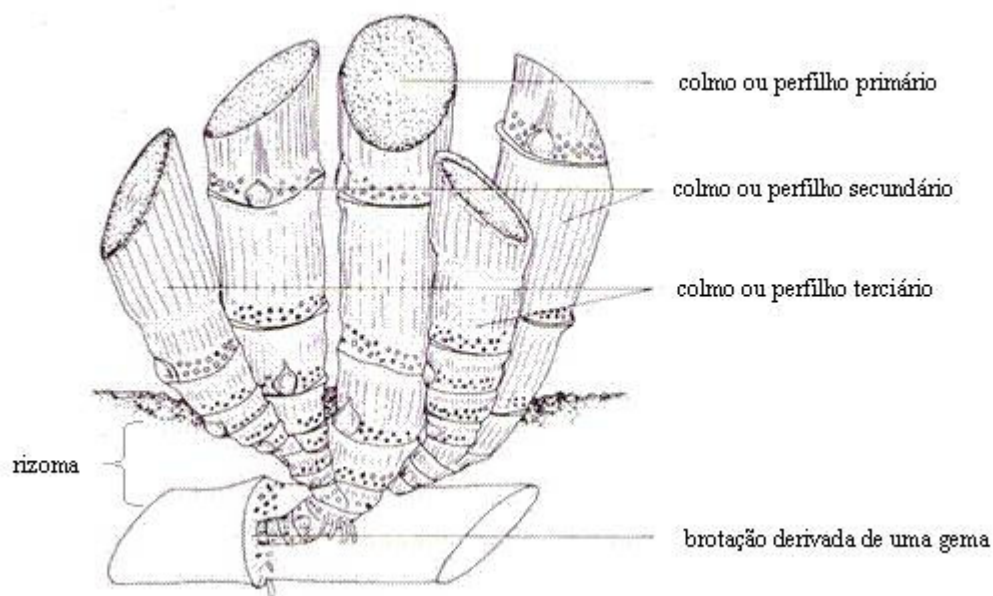


Figura 12. Ilustração representando a formação de uma touceira de cana-de-açúcar com perfilhos formados a partir de brotos de gemas presentes no rizoma. Fonte: Artscchwager e Brandes, 1958 apud James, 2004.

As estruturas apresentadas neste tópico, por apresentarem variações morfológicas entre espécies e híbridos do gênero *Saccharum*, são comumente utilizadas em estudos de taxonomia ou em descrições para registro e caracterização de novas variedades.

1.5 Origem genética das atuais variedades de cana-de-açúcar

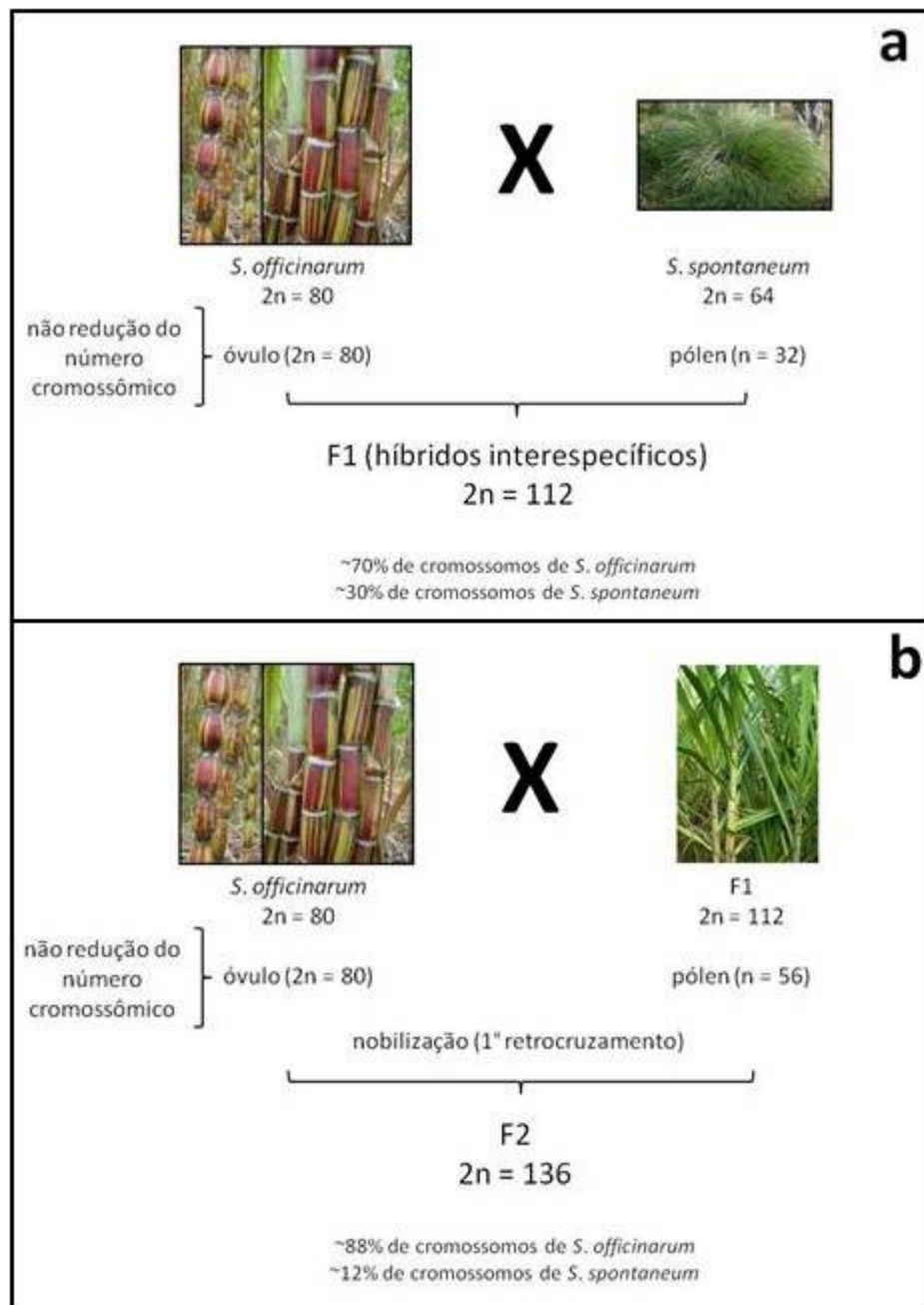
No início do século XX, pela necessidade de se obter variedades mais resistentes a diversas doenças (principalmente a uma doença conhecida como Sereh, na região da Índia e de Java) e adaptadas a diversas condições ambientais, melhoristas dos programas de melhoramento de cana-de-açúcar de Java e da Índia (Coimbatore) desenvolveram híbridos interespecíficos entre *S. officinarum* e *S. spontaneum*. Havia a intenção de solucionar os problemas de susceptibilidade a doenças e adaptabilidade. Sendo assim, *S. officinarum* manteria a herança de riqueza em sacarose e *S. spontaneum* acrescentaria a herança de rusticidade nos híbridos derivados destes cruzamentos (Ming *et al.*, 2006).

Uma característica importante deste cruzamento, observada no início do século XX, foi a transmissão $2n + n$ para formação da progênie interespecífica triploide (F1). Diversos autores publicaram estudos a respeito desse assunto e a fusão de dois megásporos (Narayanaswamy, 1940) ou a formação de gametas não reduzidos (Bremer, 1959; 1961 e 1963) eram as prováveis explicações para tal ocorrência.

À progênie destes cruzamentos interespecíficos realizaram-se sucessivos retrocruzamentos com *S. officinarum*, na intenção de conservar nos híbridos a riqueza em açúcar, introgridindo-se apenas algumas características de rusticidade, originadas de *S. spontaneum*. O processo de retrocruzamento com plantas de *S. officinarum* ficou conhecido como nobilização, em referência ao nome dado as plantas de *S. officinarum*, cana nobre (Arceneaux, 1967). Desta forma, a maior parte do genoma de um híbrido de cana-de-açúcar vem de *S. officinarum* (80%) (D'Hont *et al.*, 1996). Depois dos retrocruzamentos com *S. officinarum*, os híbridos gerados voltaram a ter capacidade de gerar cruzamentos do tipo $n + n$. Desde então, os híbridos cultivados até os dias atuais são híbridos interespecíficos e os programas de melhoramento genético espalhados pelo mundo desenvolvem novas variedades a partir da hibridação dos híbridos melhorados. Como já descrito, tanto *S. officinarum* ($2n = 80$) quanto *S. spontaneum* ($2n = 40-128$) são espécies de origem poliplóide. O cruzamento destas espécies com o processo de nobilização gerou híbridos de origens poliplóides de número cromossômico variável entre 100 e 130 cromossomos (D'Hont *et al.*, 1996).

Outro fator importante que determina a variação do número de cromossomos em cana-de-açúcar é a freqüente ocorrência de aneuploidia (Price, 1957; Price, 1963; Heinz *et al.*, 1971; Barreto e Simon, 1992). A aneuploidia é comum em espécie de origem poliplóide natural e híbrida (Sybenga, 1992) e casos de instabilidade cromossômica ocorrem predominantemente em plantas de origens poliplóides com alto número cromossômico (Barreto e Simon, 1992).

A figura 13 apresenta um esquema para ilustrar o processo de nobilização até a formação dos híbridos atuais.



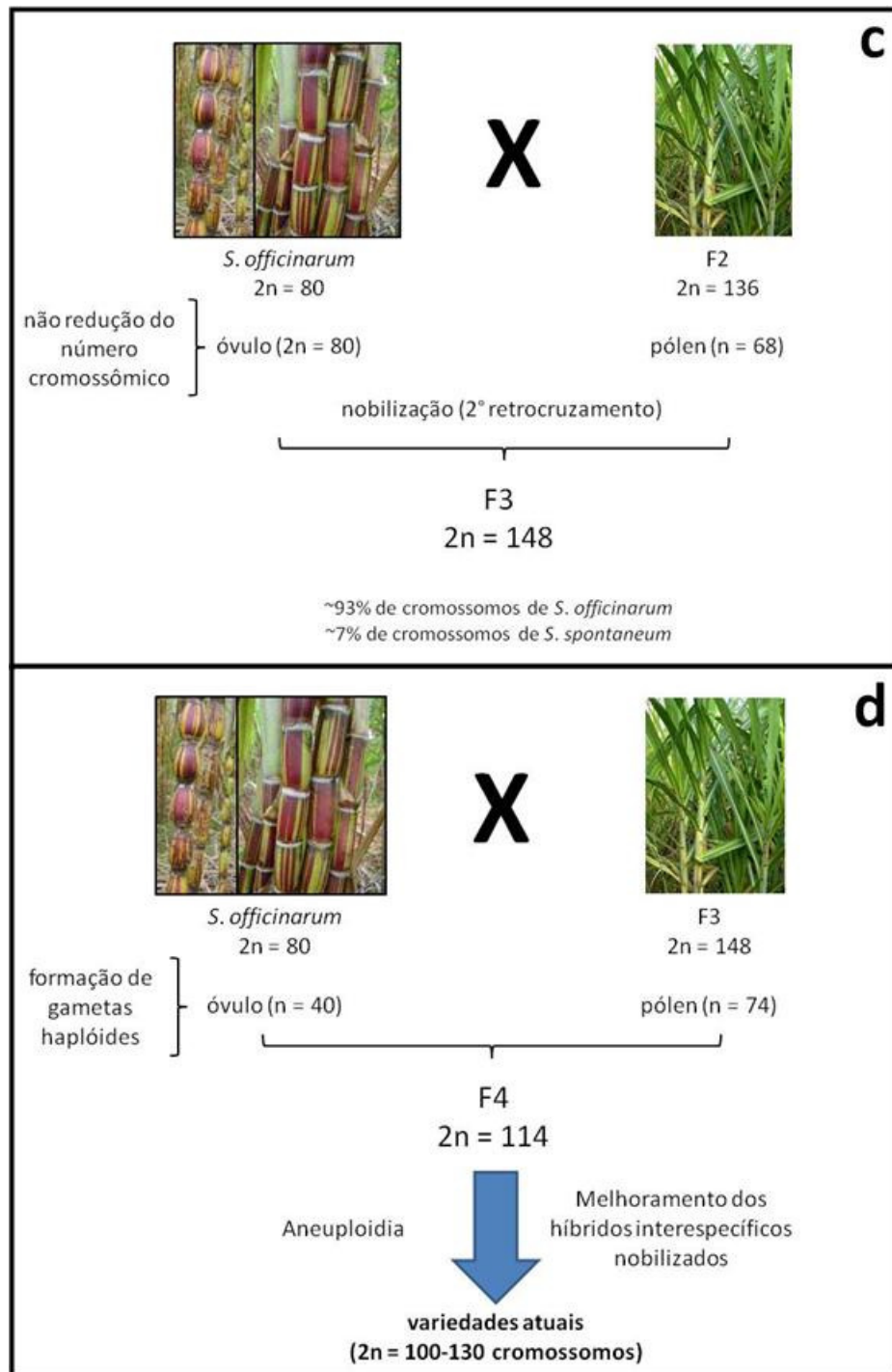


Figura 13. Esquema mostrando os cruzamentos interespecíficos entre *S. officinarum* e *S. spontaneum* (a), formando progênie nobilitada em dois retrocruzamentos com *S. officinarum* (b, c e d) até a formação dos híbridos atuais de cana-de-açúcar. Fonte: Hamilton Jordão baseada em Ming *et al.*, 2006.

Sendo assim, atuais variedades possuem número cromossômico bastante variável, entre 100 a 130 cromossomos, com 80% destes cromossomos derivados de *S. officinarum*, 10% de *S. spontaneum* e 10% dos cromossomos recombinantes entre os dois genomas (figura 14) (D'Hont *et al.*, 1996).

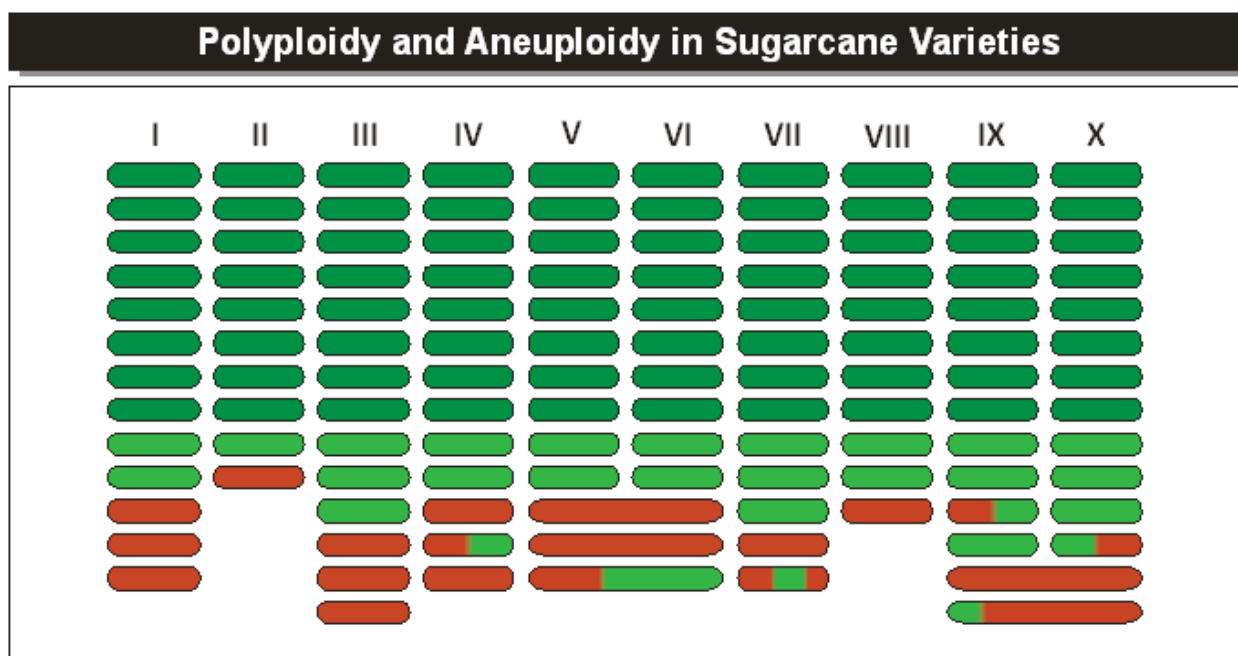


Figura 14. Esquema mostrando a organização cromossômica de um genoma de uma variedade atual de cana-de-açúcar. Em verde estão representados os cromossomos provenientes de *S. officinarum*. Em vermelho estão representados os cromossomos provenientes de *S. spontaneum*. Retirado de Grivet *et al.*, 1996.

1.6 Origem das atuais variedades de cana-de-açúcar cultivadas no Brasil

Na década de 1920 a produção sucrocanavieira brasileira sofreu uma forte queda por conta de uma epidemia de mosaico, doença causada pelo vírus do mosaico de cana-de-açúcar (Sugarcane Mosaic Virus SCMV), que resulta em grandes perdas de produtividade (Figueiredo, 2008). Nesse cenário, e com a introdução das variedades POJ (Java) e Co (Coimbatore) e com o sucesso relatado no desenvolvimento de novas variedades a partir dos híbridos nobilitados em outros países, iniciou-se o programa de melhoramento no Brasil. O Instituto Agrônomo de

Campinas (IAC) tornou-se pioneiro no melhoramento genético de cana-de-açúcar no país com o desenvolvimento das primeiras variedades brasileiras, nomeadas de IAC36-25 e IAC47-31 (Figueiredo, 2008).

Posteriormente, um novo programa de melhoramento foi criado na cidade de Campos, no estado do Rio de Janeiro, produzindo, por volta de 1955, as variedades mais cultivadas da época. Estas variedades foram nomeadas com o prefixo CB (Campos, Brasil). Na década de 40, uma grande epidemia de carvão, doença causada por um fungo, abalou pela segunda vez no século XX o setor sucrocanavieiro do país. Durante a década de 50 estes dois programas de melhoramento, IAC e CB, foram importantes no desenvolvimento de variedades resistentes a esta doença.

Por volta de 1970 outros dois programas de melhoramento foram criados no país: Planalsucar (que originou as variedades com prefixo RB (República do Brasil)) e do Centro de Tecnologia Copersucar (que originou as variedades com prefixo SP (São Paulo)). O programa Planalsucar foi transferido em 1992 para um conjunto de Universidades Federais, sendo renomeado de Ridesa. O Centro de Tecnologia Copersucar foi reestruturado em 2004 e renomeado de Centro de Tecnologia Canavieira (originando as variedades com o prefixo CTC). Dentre outros programas importantes que forneceram genitores para os programas brasileiros estão o programa CP, Canal Point, da Flórida e o programa L, Lousiana, ambos dos Estados Unidos da América.

Os programas RB e SP são marcos na história da canavieira brasileira, pelo desenvolvimento de uma série de variedades que ocuparam aproximadamente 90% da área cultivada até o início do século XXI, alavancando a produção de açúcar e álcool combustível no país e posicionando o Brasil como destaque no mundo. Mais recentemente, em 2003, a partir de investimentos de capital privado, surgiu a empresa CanaVialis S.A como o mais novo programa de melhoramento genético da cana-de-açúcar do país.

1.7 Importantes variedades de cana-de-açúcar atualmente cultivadas no Brasil

1.7.1 RB72454

A variedade RB72454, filha da variedade CP53-76 com pai desconhecido, destaca-se por sua alta adaptabilidade. Apresenta bom desempenho de produção em todos os tipos de solo. Por este motivo ocupou 7,7% da área cultivada na safra 07/08, sendo a terceira variedade mais cultivada no Brasil (Censo Varietal 2008/CTC). É uma das melhores opções para solos de baixa fertilidade de textura arenosa. Como características principais, além da baixa exigência em solo, podem ser citadas a brotação regular, bom perfilhamento, soca regular, porte ereto, alta riqueza em açúcar e maturação médio-tardia. Em relação às doenças, a RB72454 é suscetível às estrias vermelhas, à podridão abacaxi e a nematóides e intermediária ao carvão e ao mosaico (Arizono *et al.*, 2000).

1.7.2 RB835486

A qualidade que mais destaca a RB865486 é sua elevada riqueza em açúcar, acrescida de alta qualidade de caldo. Deve ser preferencialmente colhida de junho a agosto, época em que é insuperável em rendimento industrial. Outro aspecto positivo é sua longevidade de cortes, com satisfatória produção. Mesmo em solos de baixo potencial produtivo, essa variedade apresentou produtividade ótima até o quinto corte. A RB835486, filha da L60-14 também com pai desconhecido, tem sido a variedade com melhor retorno econômico, constituindo 5,5% da área cultivada do país na safra 07/08 (Censo Varietal 2008/CTC).

A maior apreensão em relação a essa variedade é a suscetibilidade à ferrugem, podendo haver, neste caso, perda de produção. Outro problema encontrado é o excessivo tombamento em situações de alta produtividade, podendo ocorrer dificuldade na colheita (Arizono *et al.*, 2000).

1.7.3 RB867515

A alta produtividade é a característica que mais destaca essa variedade. Lançada em 1998, a RB867515 é a variedade mais plantada e mais cultivada atualmente, tendo alcançado 19,6% do

total da área de cultivo na safra 07/08 (Censo Varietal 2008/CTC). Sua colheita se dá nos meses de agosto a novembro, tornando-a uma variedade médio-tardia.

Filha da RB72454 e com pai desconhecido, a maior preocupação em relação a essa variedade é a sua susceptibilidade à estria vermelha, doença causada por bactéria que reduz a produtividade do canavial (Arizono *et al.*, 2000).

1.8 Melhoramento genético de cana-de-açúcar

O processo de desenvolvimento de variedades de cana-de-açúcar em programas de melhoramento genético duram, em média, de 8 a 12 anos. Esse processo pode ser dividido em 4 partes:

a) Seleção dos progenitores.

Neste primeiro momento é fundamental que exista um banco de germoplasma com alta diversidade genética de acessos (com diferentes híbridos e espécies de cana-de-açúcar) para que se tenha grande variabilidade de características agronômicas como substrato para se formar variedades híbridas superiores (Fig. 15).



Figura 15. Vista aérea do banco de germoplasma da CanaVialis em Maceió, AL, no período de florescimento (abril a junho). Fonte: CanaVialis, 2007.

b) Hibridação dos progenitores e produção de sementes viáveis.

O melhorista, nesta etapa pode utilizar duas estratégias: (i) hibridação biparental, com a utilização de apenas dois progenitores no cruzamento, um como masculino e outro como feminino; ou (ii) hibridação multiparental (policruzamento) que utiliza diversos progenitores masculinos com apenas um feminino (figura 16) (Landell e Bressiani, 2008).



Figura 16. (a) Campânulas utilizadas em cruzamentos biparentais contendo inflorescências de um único progenitor masculino e de um progenitor feminino. Nestas campânulas as flores dos progenitores masculinos são posicionadas acima das flores dos progenitores femininos, para que o pólen caia sobre as flores e fecunde os óvulos; (b) Campânula utilizada para policruzamento contendo várias panículas de diversos progenitores; (c) grupo de sementes obtidas de uma panícula proveniente de um progenitor feminino. Fonte (a, b e c): CanaVialis, 2007.

A estratégia de policruzamento é bastante utilizada pelos programas de melhoramento de cana-de-açúcar. Variedades cultivadas de grande importância econômica atualmente (RB865715, RB72454, RB835486) são derivadas desta estratégia e por este motivo possuem pais desconhecidos. Essa estratégia é bastante utilizada na cultura da cana-de-açúcar devido à dificuldade que os melhoristas encontram para escolher a combinação ideal de progenitores e obter uma variedade que apresente todas as características morfológicas e agrônômicas desejadas. (José Antônio Bressiani – comunicação pessoal).

c) Seleção na progênie dos melhores indivíduos de acordo com as características desejadas.

Este processo tem duração de vários anos, pois para que uma planta de cana-de-açúcar se torne uma variedade é necessário que ela possua um conjunto de características agronômicas (aproximadamente 40), tais como resistência a várias doenças, alto teor de sacarose, bom perfilhamento, boa plantabilidade, etc. As avaliações de todas estas características são processos extremamente laboriosos e que devem ser executados com grande precisão e repetidos por vários anos. Sendo assim, o processo de avaliação e seleção na progênie dos indivíduos superiores é realizado ano a ano (cada ano para um conjunto de características) até a obtenção da(s) melhor(es) variedade(s);

d) Registro da variedade selecionada.

Este processo é importante, pois é o que assegura aos pesquisadores ou instituições de pesquisa em melhoramento o direito de explorar comercialmente as novas variedades desenvolvidas (Bernet *et al.*, 2003), garantindo a principal fonte de renda à estas instituições pelo recebimento de *royalties* pagos pelo produtor de acordo com a área ocupada pela nova variedade em questão.

1.9 A citogenética no melhoramento de plantas

Características cariotípicas (número, forma e tamanho dos cromossomos), padrão de bandas do DNA no cromossomo, número e localização de sítios específicos de DNA nos cromossomos, além do comportamento dos cromossomos durante os processos meióticos e mitóticos são alguns dos aspectos estudados pela citogenética que contribuem com um conjunto de informações relevantes para o entendimento da planta em si e de seu processo de melhoramento genético. Além desses aspectos gerais estudos que envolvem a frequência de recombinação entre genomas homólogos e homeólogos, detecções de anomalias cromossômicas e análises de fertilidade são também amplamente aplicados nessa área (Sybenga, 1992). Mais recentemente, com o advento do melhoramento genético de plantas através do desenvolvimento de plantas transgênicas, a citogenética também tem contribuído para a identificação e quantificação físicas de transgenes.

Mapas citogenéticos mostram a posição de marcadores genéticos em relação a componentes cromossômicos como centrômeros, telômeros, cromômeros, heterocromatinas e regiões organizadores do nucléolo (NORs) relacionando dados genéticos e seqüências moleculares com informações morfológicas dos cromossomos (Jong *et al.*, 1999; Wang e Chen, 2005).

Em milho ($2n = 2x = 20$), por exemplo, mapas citogenéticos têm sido construídos através da visualização de seqüências de DNA em cromossomos mediante a técnica de hibridização *in situ* (ISH) e estes têm sido usados para a detecção de aberrações cromossômicas, determinação de cromossomos aneuploides, detecção de variações de seqüências repetitivas e elementos transponíveis no genoma, análises do comportamento dos cromossomos durante a meiose e mitose, localização de transgenes entre outros (Wang e Chen, 2005; Kato, *et al.*, 2004). Em trigo ($2n = 6x = 42$), mapas citogenéticos de cada grupo homeólogo permitiram estabelecer a sintenia e colinearidade entre os sub-genomas de trigo e também entre esses sub-genomas e genomas de outros gêneros, incluindo *Aegilops*, *Hordeum*, *Oryza*, *Zea* e *Avena* (Gupta *et al.*, 2005). Além dessas aplicações, genes que foram introduzidos em plantas transgênicas de trigo puderam ser localizados fisicamente em seus cromossomos permitindo-se a distinção do genoma de inserção. Plantas transgênicas de tritcale e cevada também tiveram seus transgenes localizados através de técnicas de citogenética (Pedersen, *et al.*, 1997).

Técnicas de hibridizações *in situ* têm sido fundamental para o avanço do uso da citogenética no melhoramento de plantas. A técnica de FISH consiste basicamente no pareamento de segmentos específicos de DNA ou RNA com uma seqüência complementar no cromossomo, visando a identificação da seqüência e sua localização. Para isso marca-se o DNA ou RNA que será hibridizado com uma molécula de fácil identificação, sendo mais comumente utilizados fluocromos acoplados à nucleotídeos, num processo conhecido como marcação direta. Ou em um segundo processo, na marcação indireta, emprega-se moléculas marcadoras, como a biotina e/ou a digoxigenina, que serão posteriormente ligadas a um fluocromo ou a outro sistema de coloração, permitindo-se, nesse caso, a utilização de sistemas de amplificação do sinal (Gerra, 2004). Essa técnica foi utilizada pela primeira vez por Gall e Pardue (1969) para análises cromossômicas e por Buongiorno-Nardelli e Amaldi (1969) em cortes histológicos.

O processo é muito semelhante para a técnica de GISH sendo o principal diferencial a natureza da sonda utilizada. Enquanto na FISH utilizam-se seqüências específicas de DNA ou

RNA, na GISH utiliza-se DNA genômico digerido (Guerra, 2004). Através do uso de sondas genômicas a técnica permite análises de híbridos interespecíficos e estudos evolutivos de diversas espécies de origem poliplóide (Stace e Bailey, 1999 apud Guerra, 2004).

A figura 17 descreve sucintamente a técnica de hibridização *in situ*.

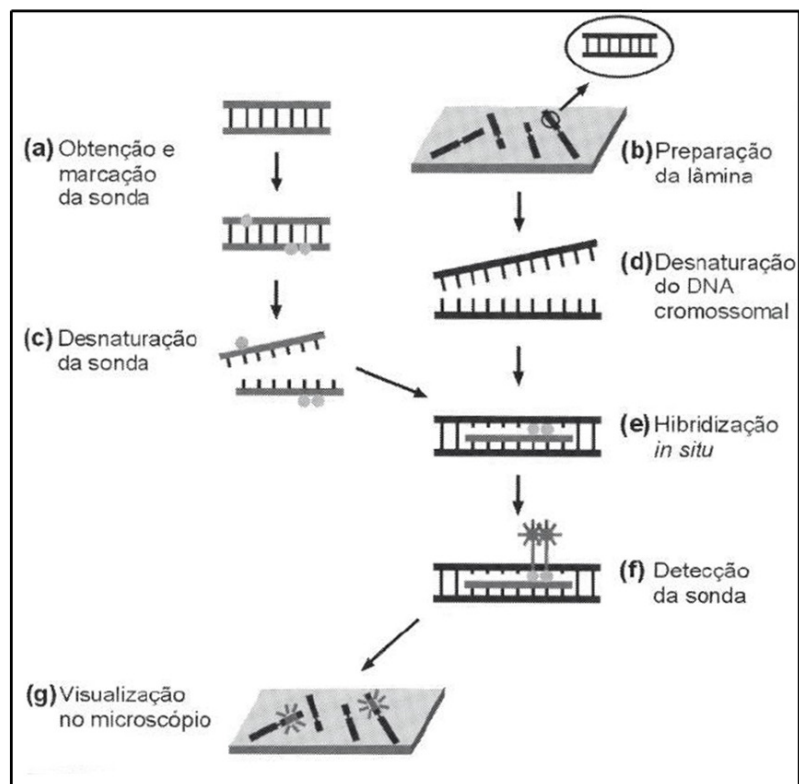


Figura 17. Principais etapas da técnica de hibridização *in situ*. A marcação da sonda (a) é feita em paralelo à preparação da lâmina (b). Em seguida, a sonda e o DNA cromossômico são desnaturados (c, d) e, quando colocados em contato, a sonda hibridiza *in situ* (e) com o DNA-alvo. A marcação da sonda pode ser detectada por anticorpos ligados a fluorocromos (f) e visualizada diferencialmente ao microscópio (g).

1.10 Estudos cromossômicos em cana-de-açúcar

Pesquisas na área de citogenética vegetal têm crescido muito, principalmente nas últimas duas décadas, com o desenvolvimento de técnicas de hibridizações *in situ*, FISH e GISH. No entanto, citologicamente, o gênero *Saccharum* tem sido pouco estudado, quando comparado com outras culturas economicamente importantes como trigo e milho. Dificuldades técnicas, devido

ao alto número cromossômico e ao tamanho reduzido dos mesmos, seriam as principais explicações para este cenário (D'Hont *et al.*, 2005).

O interesse por estudos envolvendo análise dos cromossomos de cana-de-açúcar surgiu no início do século XX, juntamente com o início dos primeiros programas de melhoramento genético. A caracterização cromossômica das principais espécies do gênero e o entendimento do processo de nobilitação, descrito anteriormente, foram as base dos primeiros trabalhos em citogenética de cana-de-açúcar.

Bremer (1923) descreveu como sendo $2n = 80$ e $2n = 112$ os números cromossômicos das espécies *S. officinarum* e *S. spontaneum*, respectivamente. Neste mesmo trabalho iniciaram-se as primeiras hipóteses da transmissão $2n+n$, caracterizada melhor anos depois, uma vez que o mesmo autor observou que híbridos F1 provenientes de cruzamentos entre *S. officinarum* e *S. spontaneum* possuíam $2n = 136$.

Outros clones de *S. officinarum* e *S. spontaneum* foram estudados, caracterizando *S. officinarum* como uma espécie com número cromossômico constante ($2n = 80$) e *S. spontaneum* como uma espécie que apresenta vários citótipos, com $2n$ variando de 40 a 128 cromossomos. Além dessas espécies, outras espécies do gênero, *S. robustum* ($2n = 60$ e 80), *S. sinensis* ($2n = 80$ - 124) e *S. barberi* ($2n = 111$ - 120) também tiveram seus números cromossômicos relatados. (Price, 1957; Price, 1961; Burner, 1991).

Conforme mencionado anteriormente, o entendimento do processo de nobilitação fez com que muitos estudos em citogenética de cana-de-açúcar fossem desenvolvidos. Observação relevante desse processo foi o fato da transmissão $2n+n$ ser mais amplamente observado em cruzamentos envolvendo *S. officinarum* e *S. spontaneum* e mais especificamente, utilizando-se *S. officinarum* como fêmea (Price, 1957; Price, 1961). E esse comportamento foi observado somente até o segundo retrocruzamento (*Back Cross* - BC2), sendo após este observada a transmissão $n+n$ (Price, 1963; Kandasami, 1978). Para se entender melhor a formação de gametas $2n$, Narayanaswamy (1940) primeiro reportou que os mesmos eram originados pela fusão de dois megásporos. Posteriormente, Bremer (1959, 1961, 1963), aprofundando os estudos de formação do gameta feminino, formulou duas hipóteses para formação de gametas $2n$, as duas ocorrendo depois da primeira divisão da meiose. A primeira hipótese é de que todos os cromossomos se duplicam dentro da região denominada chalaza e a segunda é de que ocorre uma divisão dos cromossomos dentro do núcleo díade, e por conta disso, a segunda divisão da meiose deixaria de

ocorrer. Deste modo, provavelmente gametas $2n$ seriam originados pela endoduplicação ou por fusão de dois núcleos depois da segunda divisão da meiose (Shipad e Gill, 1985).

A estabilidade meiótica também é objeto de estudos importantes para os programas de melhoramento de cana-de-açúcar. Burner (1991) analisou 31 clones pertencentes ao Complexo *Saccharum* utilizados em programas de melhoramento e relatou pareamento bivalente predominante em todos os clones; no entanto, os clones de *Saccharum* apresentaram mais irregularidades na meiose quando comparados com clones dos outros gêneros. Em um estudo de progênies provenientes de cruzamentos entre híbridos de *Saccharum* spp. e *S. spontaneum* foi observado pareamento bivalente predominante, no entanto algumas irregularidades meióticas (univalentes, pareamento multivalente, múltiplos nucléolos, pontes na anáfase, retardatários, sincícios), aneuploidia e mosaicismo foram associadas à freqüente formação de gametas aneuplóides (Burner e Benjamin, 1993).

Variedades híbridas (*Saccharum* spp. $2n = 100-130$) são derivadas de cruzamentos intraespecíficos entre *S. officinarum* ($2n = 80$) e *S. spontaneum* ($2n = 40-128$) (Arceneaux, 1965). Poucas variedades tiveram, até o momento, seu número cromossômico determinado. Isto deve-se às dificuldades técnicas encontradas por causa do alto número de cromossomos e ao seu reduzido tamanho (1 a $3\mu\text{m}$) (Ha *et al.*, 1999).

As primeiras variedades híbridas com números cromossômicos definidos foram variedades POJ e Co, com números variando entre 92 e 148 cromossomos (Barreto e Simon, 1982). Jenkin *et al.* (1995) estudaram as variedades MQ66-14 e 85N904 e obtiveram os números $2n = 112$ e $2n = 110$, respectivamente. Outra variedade amplamente estudada foi a R570 ($2n = 107-115$), não só em estudos citogenéticos mas em estudos genéticos, envolvendo marcadores moleculares (D'Hont *et al.*, 1996). Cudrado *et al.* (2004) caracterizaram o número cromossômico de mais três variedades, My5514 ($2n \sim 103$), B42231 ($2n \sim 110$) e C236-51 ($2n \sim 115$). Variedades utilizadas pelo setor sucroalcooleiro brasileiro foram caracterizadas por Kunieda *et al.* (1984), IAC4865 ($2n = 118$) e por Silvarolla *et al.* (1994), NA56-79 ($2n = 114$) e Co419 ($2n = 113$).

Na década de 90, iniciaram-se os primeiros estudos de citogenética molecular para cana-de-açúcar. Estes estudos visavam determinar o número básico das principais espécies do gênero e ampliar o conhecimento a respeito da contribuição genética dos progenitores em variedades modernas e espécies híbridas como *S. robustum* e *S. sinensis*. O número básico das espécies pode

ser esclarecido através de experimentos de FISH, utilizando sondas de DNA ribossomais, 45S e 5S, que já eram amplamente utilizadas em outras espécies como trigo e milho.

Dessa forma determinou-se o número básico $x = 10$ para *S. officinarum* ($2n = 8x = 80$) e *S. robustum* ($2n = 8x = 80$), representando um *locus* em oito cópias e o número básico $x = 8$ para *S. spontaneum* ($2n = 8x = 64$, $10x=80$, $12x=96$ e $14x=112$), representando um *locus* em oito, dez e doze cópias respectivamente. (D'Hont *et al.*, 1995; D'Hont *et al.*, 1998; Há *et al.*, 1999). Além da localização dos sítios de DNA ribossomal (rDNA) nas principais espécies do gênero, Cuadrado *et al.* (2004) descreveram o número de sítios 45S e 5S em algumas variedades. Nas variedades My5514 ($2n \sim 103$) e B42231 ($2n \sim 110$) foram descritos 10 sítios de cada um dos genes ribossomais, enquanto que na variedade C236-51 ($2n \sim 115$) foram descritos 12 cópias de cada um deles. Em todos os casos, estes sítios foram localizados em cromossomos diferentes.

A composição genética de híbridos de cana-de-açúcar pôde ser melhor compreendida através de experimentos de GISH. Dessa forma determinou-se que em variedades modernas de cana-de-açúcar, como por exemplo, a R570 ($2n \sim 115$), 10% dos cromossomos são provenientes de *S. spontaneum*, 80% são provenientes de *S. officinarum* e 10% são cromossomos recombinantes entre os dois genomas, demonstrando a capacidade de recombinação entre os genomas homeólogos (D'Hont *et al.*, 1996). Essa técnica também foi aplicada para determinar a composição das espécies *S. sinensis* e *S. barberi* e confirmou a provável origem dessas espécies descritas como híbridos naturais entre *S. officinarum* e *S. spontaneum* (D'Hont *et al.*, 2002). Além disso, a técnica de GISH também foi aplicada para analisar a composição genética de híbridos provenientes de cruzamentos entre *Saccharum* e *Erianthus* (Piperidis *et al.*, 2000).

2. OBJETIVOS

Contribuir com informações citogenéticas básicas para programas de melhoramento genético de cana-de-açúcar mediante a:

- a) Padronização das técnicas de citogenética para estudos em cana-de-açúcar;
- b) Confirmação, mediante a determinação do número cromossômico, da exata identificação das espécies *S. officinarum* e *S. spontaneum*;
- c) Quantificação dos cromossomos das variedades brasileiras, RB72454, RB835486 e RB867515;
- d) Análise e quantificação dos sítios dos marcadores rDNA 45S e 5S nas três variedades e nas duas espécies citadas acima.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção do material vegetal

Colmos das espécies *S. officinarum* e *S. spontaneum* e colmos das variedades RB72454, RB867515 e RB835486 foram fornecidos pelo banco de germoplasma da empresa CanaVialis SA. Todos os exemplares foram utilizados exclusivamente para fins de pesquisa científica. Os colmos de cana-de-açúcar foram cortados em mini-toletes de aproximadamente 5 cm, região do nódio, na qual está localizada a gema e os primórdios radiculares. A figura 8 ilustra o nódio em cana-de-açúcar.

Foram testadas duas condições de enraizamento. Na primeira utilizou-se uma caixa plástica, na qual foram colocados papéis filtro umedecidos com água juntamente com os mini-toletes. A caixa foi embalada com plástico preto para evitar a presença de luz e o conjunto foi mantido a 38°C por aproximadamente 3 dias.

A segunda condição testada foi similar às condições naturais de enraizamento. Os mini-toletes foram mantidos em bandejas com substrato, com partes iguais de terra e vermiculita, em temperatura ambiente (TA) e sob irrigação por aproximadamente 3 dias.

Após o tempo mencionado as raízes que apresentavam cerca de 1cm foram cortadas com o auxílio de um bisturi e submetidas aos pré-tratamentos.

3.2 Pré-tratamento e fixação do material

As raízes foram submetidas a diferentes tratamentos com agentes anti-mitóticos, comumente utilizados em técnicas de citogenética, visando-se a melhor condição de condensação e espalhamento dos cromossomos. Os seguintes reagentes foram utilizados, isolados ou combinados em partes iguais: 8-hidroxiquinolina (8-HQ) (2mM), ciclohexamida (0,009%) e colchicina (0,1%). Os reagentes foram utilizados em volume suficiente para cobrir as raízes em

um frasco tipo falcon, de polipropileno. As raízes foram mantidas em diferentes condições de temperatura (4°C, 16°C, TA) com o tempo variando de 3 a 24 horas (h).

Após o pré-tratamento, as raízes foram fixadas em solução Carnoy 3:1 (etanol:ácido acético v/v) em TA, por 24 h e armazenadas a -20°C até o seu uso (Silvarolla *et al.*, 1994).

3.3 Preparações mitóticas

As raízes armazenadas em fixador a -20°C foram submetidas a três lavagens com H₂O milli-Q para remoção do fixador e a mais duas lavagens com tampão citrato de sódio pH4,8, visando a adaptação do tecido ao tampão de digestão.

O próximo passo foi a hidrólise enzimática combinando celulase (Sigma) 2% e pectinase (Sigma) 20%, podendo variar o tempo de 1 a 3 h de acordo com a resistência do tecido. Com o auxílio de uma lupa pode-se separar o meristema radicular da coifa. A seguir, esse meristema foi esmagado entre lâmina e lamínula, em uma gota de ácido acético 45%. As lâminas foram congeladas em N₂ para remoção da lamínula e, depois de secas, foram coradas com Giemsa 2% (Guerra e Souza 2002). Posteriormente, foram observadas ao microscópio de luz objetivando a determinação do número cromossômico. Para os experimentos de hibridização *in situ*, após a remoção da lamínula, as lâminas foram armazenadas a -20°C até a sua utilização.

3.4 Contagem dos números cromossômicos

Crêterios de confiabilidade foram estabelecidos para contagem do número de cromossomos. Os principais crêterios foram boa condensação cromossômica e bom espalhamento cromossômico e, se possível, ausência de citoplasma.

A condensação cromossômica foi crêterio eliminatório. Os cromossomos precisavam ser vistos como unidades isoladas e com morfologia bem definida para que a metáfase pudesse ser selecionada. Após isso foram analisados os espalhamentos. Uma combinação de condensação

cromossômica e espalhamento fazia com que a metáfase recebesse uma nota de 1 a 3 (regular, médio e bom), exemplificado pela figura 18. Um dos mais importantes critérios para se estabelecer essa nota foi o número de incertezas, devido à sobreposição de cromossomos, que a metáfase apresentava. Dez metáfases com notas 3 ou 2 foram escolhidas para se determinar o número cromossômico de cada variedade. A nota da metáfase foi ponderada com o número cromossômico encontrado, ou seja, uma metáfase com 60 cromossomos e nota 3 foi contabilizada como 3 contagens de 60 cromossomos, enquanto uma outra com 58 cromossomos, e nota 2, foi contabilizada como 2 contagens de 58 cromossomos.

Os parâmetros média, desvio padrão, coeficiente de variação, moda e amplitude foram calculados para cada variedade.

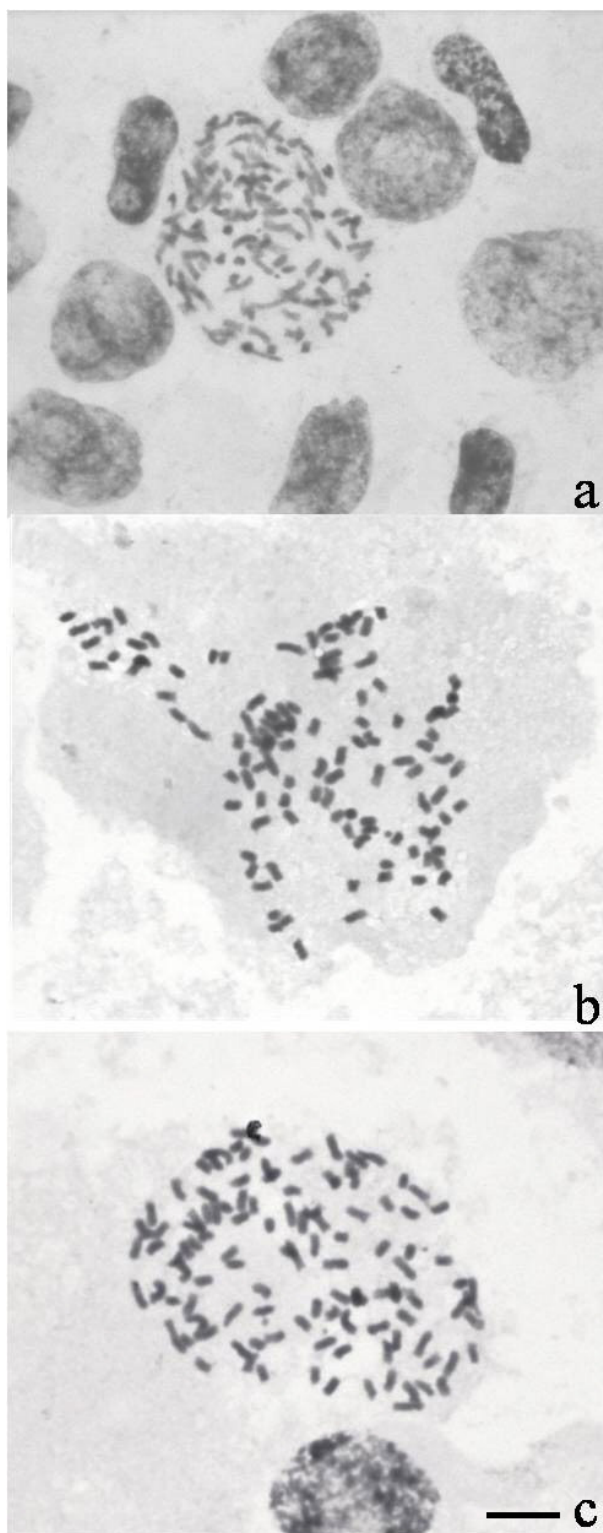


Figura 18. Cromossomos em pró-metáfase e metáfase mitótica da variedade de *Saccharum* spp. com diferentes qualidades de preparações. (a) Nota 1. (b) Nota 2. (c) Nota 3. Barra = 10 μ m.

3.5 Hibridizações *in situ* Fluorescente (FISH)

3.5.1 Preparação da sonda rDNA 45S

O fragmento de rDNA 45S (contendo as seqüências 28S-5,8S-18S de *Triticum aestivum*), clonado em plasmídeo pUC18 em *Escherichia coli* (sonda pTa71, (Gerlach e Bedbrook, 1979) foi isolado através da metodologia de extração de DNA plasmidial (miniprep).

Primeiramente a bactéria *E. coli* contendo o plasmídeo foi inoculada em meio de cultura LB líquido com 10ug/ml de carbenicilina e mantidas por cerca de 18 h em shaker com agitação constante de 0,8g a 37°C. Após o crescimento da cultura, iniciou-se o processo de extração de DNA plasmidial de acordo com os passos seguintes:

(a) 10 ml de cultura foram centrifugados por 6 minutos (min) a 0,8g, e o sobrenadante foi descartado;

(b) o precipitado foi ressuspendido em 400µl de solução I (10mM EDTA pH 8,0; 26mM tris-HCl, glicose monohidratada 380mM) agitando em vortex e incubado a TA por 10 min;

(c) foram adicionados ao tubo eppendorf 500µl da solução II (200mM NaOH; 1% SDS), misturou-se por inversão e colocando-o em gelo por 5 min;

(d) foram adicionados 300µl da solução III (acetato de potássio 3M, pH 5,4), misturados por inversão e colocou-se no gelo por mais 5 min;

(e) o material, já lisado, foi centrifugado para separação das fases por 10 min a 16100g e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo eppendorf, sendo o restante descartado;

(f) no sobrenadante procedeu-se uma extração de DNA com fenol/clorofórmio adicionando-se clorofane (fenol: clorofórmio: álcool isoamílico, 25: 24: 1), na proporção 1:1 e misturando-se por inversão (20 vezes);

(g) a mistura foi centrifugada por 10 min a 16100g;

(h) o sobrenadante foi transferido com cuidado para um novo tubo e foram adicionados 2µl de RNase (10mg/ml) e incubados a 37°C por 20 min;

(i) o DNA foi então precipitado com 1 volume de isopropanol gelado e mantido 3 h a -20°C;

(j) após a precipitação centrifugou-se por 10 min a 16100g e o sobrenadante foi descartado; o precipitado foi lavado com 1ml de etanol 70% e centrifugado novamente por 10 min a 16100g;

(l) o sobrenadante foi novamente descartado e o precipitado foi mantido a TA até secagem do tubo e ressuspendido em 50µl de água MilliQ. O DNA foi quantificado em espectrofotômetro digital através de medição direta da absorbância a 260nm.

A sonda pTa71 foi marcada através da técnica de Nick Translation, utilizando-se o kit BioNick (Invitrogen) com biotina-14dATP. O DNA obtido através da extração plasmidial foi diluído a uma concentração de 1µg/ul. Em gelo seguiram-se os seguintes passos:

(a) adicionou-se a um tubo eppendorf 5µl de 10x *dNTP Mix*, 1µl (1µg) de DNA, 5µl 10x *Enzyme Mix* e 34µl água MilliQ. Após adição de todos os reagentes a mistura foi cuidadosamente agitada garantindo total homogeneidade dos reagentes,

(b) a mistura foi incubada a 16°C por 90 min em termociclador;

(c) o DNA marcado foi submetido a uma precipitação com 0,1 volume de acetato de sódio 3M e 2 volumes de etanol absoluto gelado. Esta solução foi levemente homogeneizada e mantida a -20°C por 3 h. Após esse tempo centrifugou-se a mistura a 16100g por 10 min, o sobrenadante foi descartado e o precipitado mantido a TA até total secagem do tubo;

(d) o precipitado foi ressuspendido em 50µl de água MilliQ e armazenado a -20°C até a utilização na hibridização.

3.5.2 Preparação da sonda rDNA 5S

A sonda de rDNA 5S foi preparada mediante a Reação da Polimerase em Cadeia (*Polymerase Chain Reaction* - PCR). Para isso foi solicitada a síntese de *primers* (Prodimol) para amplificação do gene ribossomal 5S de cana-de-açúcar. As seqüências dos *primers* foram baseadas na seqüência do gene ribossomal 5S do genoma de trigo (*Triticum aestivum* L.) (Cox *et al.*, 1992).

Tabela 1. Seqüência dos *primers* utilizados para amplificação do gene 5S em cana-de-açúcar.

Primer	Seqüência
P1	5' -TGGGAAGTCCT (C/T)GTGTTGCA- 3'
P2	5' - (T/G)T(A/C)G(T/C)GCTGGTATGATCGCA- 3'

Para as reações de PCR extraíram-se DNA genômico de folhas de cana-de-açúcar pelo método de CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio). Em tubos eppendorf de 2ml adicionou-se aproximadamente 100mg de tecido macerado e 700µl de tampão de extração (100 mM Tris-HCl pH 8, 20mM EDTA, 2% CTAB, 1% PVP 40, 1,4M NaCl, 0,3% 2-mercaptoetanol, 50µg RNase A). A suspensão foi misturada vigorosamente em vortex e incubada a 65°C por 30 minutos. À mistura adicionou-se 800µL de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). Após centrifugação (16100g por 10 min a TA) recuperou-se aproximadamente 450 µl de sobrenadante que foi transferido a um novo tubo eppendorf. À mistura adicionou-se 450µl de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) e aproximadamente 400µl sobrenadante foi recuperado após centrifugação nas condições descritas acima. Após agitação por inversão recuperou-se o *pellet* de DNA por centrifugação (16100g por 5 min a TA). O *pellet* foi lavado com 1 ml de etanol 70%, seco a TA e ressuspendido em 50µl de tampão TE (10 mM Tris-HCl pH8,0, 1 mM EDTA). A concentração de DNA de cada amostra foi quantificada em espectrofotômetro NanoDrop™ 8000 (www.nanodrop.com).

Foram utilizados 50ng de DNA genômico acrescidos de 200µM de cada *primer*, 200µM de dNTP mix e 1x PCR tampão de reação (10mM Tris-HCl, pH8,3, 50mM KCl, 1,5mM MgCl₂). A amplificação foi realizada em termociclador GeneAmp 9700 (Applied Biosystems) com a seguinte programação: desnaturação inicial de 5 min a 94°C; 35 ciclos de 94°C por 30 segundos (seg), 55°C por 30 seg e 72°C por 30 seg; e extensão final de 72°C por 10 min. O produto de amplificação foi separado em gel de agarose 1% em tampão TAE 1x (Tris-Acetato-EDTA) a 90 V por 1,5 h.

Após confirmação da amplificação do gene 5S em cana-de-açúcar utilizou-se o mesmo par de *primer* para proceder a marcação da sonda, também por PCR. Nesse caso foi utilizado o Kit PCR DiG probe Synthesis (Roche). Para o mix de reação foram acrescentados 50ng de DNA, 200µM de cada primer, 1x tampão de reação PCR (10mM Tris-HCl, pH8,3, 50mM KCl, 1,5mM

MgCl₂) e 0,1 volume de PCR DIG Probe Synthesis Mix (2mM dATP, 2mM dCTP, 2mM dGTP, 1,3mM dTTP, 0,7mM DIG-11-dUTP). A amplificação foi realizada em termociclador GeneAmp 9700 (Applied Biosystems) com a seguinte programação: desnaturação inicial de 5 min a 94°C; 35 ciclos de 94°C por 30 seg, 55°C por 30 seg e 72°C por 30 seg; e extensão final de 72°C por 10 min.

3.5.3 Hibridização *in situ* fluorescente

A aplicação da FISH seguiu a metodologia descrita por Schwarzscher e Heslop-Harrison (2000) com algumas modificações. De maneira geral a utilização da técnica foi feita em 4 etapas descritas a seguir:

a) Tratamento das lâminas e hibridização *in situ*

As lâminas foram tratadas com 50µl RNase A (100µg/ml) pH 7,0 a 37°C por 1 h e posteriormente lavadas em 2xSSC (0,3M cloreto de sódio, 0,03M de citrato de sódio, pH 7,0) por 10 min sob agitação. As lâminas foram então tratadas com paraformaldeído 4% por 10 min e posteriormente lavadas novamente com 2xSSC por 10 min sob agitação.

Então as lâminas foram submetidas a desidratação com série alcoólica (etanol 70% por 5 min e etanol absoluto por mais 5 min) e secas em TA.

Paralelamente foi preparada a mistura de hibridização composta de formamida 50% (v/v), dextrano sulfato a 10%, 2xSSC 50% (p/v), 100ng de sonda marcada, 10ug de DNA de esperma de salmão como DNA bloqueio, SDS 1% (p/v). A mistura de hibridização foi previamente desnaturada por 10 min a 70°C e mantida em gelo até a sua utilização.

Foram adicionados 30µl da mistura de hibridização sobre cada lâmina e a mesma coberta com lamínula. Estas foram mantidas em termociclador em ciclos de 10 min a 90°C, 50°C e 38°C. A seguir, as lâminas foram mantidas em estufa a 37°C por no mínimo 18 h, em câmara úmida e no escuro.

b) Banhos pós-hibridizações

Os banhos pós hibridizações foram realizados com 2xSSC por 5 min a 42°C, formamida 20% em 0,1xSSC a 42°C por 10 min, 0,1xSSC a 42°C por 5 min, 2xSSC a 42°C por 5 min, 4xSSC/Tween 20 0,2% a 42°C por 5 min e 4xSSC/Tween 20 0,2% a TA, todos sob agitação.

c) Detecção da hibridização

As lâminas foram primeiramente tratadas com 50µl BSA 5% por 5 min; posteriormente, foram adicionados 50µl da solução de detecção por lâmina, contendo 1µl de avidina-FITC (2mg/ml) ou 1µl de anti-digoxigenina-Rodamina (0,2mg/ml) mais 49µl BSA 5% e cobertos com lamínula. As lâminas foram mantidas no escuro em câmara úmida por 1 h. Após o tempo de detecção as lâminas foram lavadas duas vezes com 4xSSC por 10 min cada, também no escuro e sob agitação.

d) Coloração

Sobre as lâminas foram aplicados 25µl de solução de coloração de iodeto de propídeo 3µg/ml (Sigma) ou 4,6-diamino-2-fenil indol 6µg/ml (DAPI/Sigma). A solução permaneceu sobre a lâmina por 10 minutos e após isso foi feita uma lavagem com 4xSSC/Tween 20 0,2% a TA. Após essa lavagem acrescentou-se em cada lâmina 25µl de Vectashield Mounting Medium (Vectorlabs), cobrindo a preparação com lamínula de vidro. As mesmas foram mantidas a 4°C até o registro dos resultados.

3.6 Registros dos resultados

As preparações cromosômicas, obtidas pela técnica de coloração convencional e de hibridização *in situ*, foram analisadas em fotomicroscópio de fluorescência Olympus, modelo BX51. Os resultados foram registrados pela captura de imagens com câmera digital refrigerada acoplada ao fotomicroscópio, mediante o uso do programa Pro-Image-Plus 6.0.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Obtenção dos colmos, enraizamento e preparações citológicas

Nos dois experimentos montados para se obter o enraizamento dos mini-toletes, após três dias foi possível coletar raízes do tamanho esperado (aproximadamente 1 cm de comprimento).

No entanto, no primeiro experimento (germinado a 38°C em caixa úmida) as raízes obtidas apresentaram-se mais limpas e flexíveis do que no segundo (substrato em condições naturais, sob irrigação). A ausência de resíduos de substratos (e contaminantes) é desejável durante as etapas de pré-tratamento, fixação e preparação citológica. A ausência de substrato no enraizamento impõe menos resistência durante o crescimento da raiz, o que provavelmente faz com que o tecido seja menos rígido, característica favorável à digestão. Testes preliminares fizeram com que padronizássemos o método para enraizamentos dos colmos em caixa úmida a 38°C neste estudo. Entre os agentes testados no pré-tratamento, tanto as combinações de 8-HQ com ciclohexamida e colchicina, como o uso de 8-HQ isolado demonstraram bons resultados. O tempo do tratamento e a temperatura também foram fatores variáveis. A tabela 2 resume os melhores pré-tratamentos obtidos e aplicados nas espécies e variedades estudadas.

Tabela 2. Melhores pré-tratamentos estabelecidos para espécies e variedades de cana-de-açúcar em estudo.

Cultivar	Pré-tratamento
<i>S. spontaneum</i>	8HQ 2mM por 3 h a TA
<i>S. officinarum</i>	8HQ 2mM por 3 h a TA
RB72454	8HQ 2mM:colchicina 0,1%: ciclohexamida 0,009% por 6 h a 16°C
RB835486	8HQ 2mM:colchicina 0,1%: ciclohexamida 0,009% por 6 hs a TA
RB867515	8HQ 2mM:colchicina 0,1%: ciclohexamida 0,009% por 7 h a 16°C

Silvarolla *et al.* (1994) também obtiveram resultados similares com a combinação de agentes no pré-tratamento. A combinação de 8-HQ 2mM mais ciclohexamida 0,009% foi a melhor opção encontrada por estes autores para a variedade NA56-79, enquanto a combinação de

ciclohexamida 0,007% mais α -bromonaftaleno 2% e DMSO mostrou-se mais eficiente para a variedade Co419 (Silvarolla *et al.*, 1994). Em nosso estudo pode-se observar que nas análises das variedades, que possuem maior número de cromossomos, a combinação de 8HQ, ciclohexamida e colchicina foi mais eficiente do que o uso de 8HQ isolado. Para as espécies, com uma menor quantidade de cromossomos, somente a 8HQ já foi eficiente para a obtenção de metáfases bem condensadas.

A colchicina e a 8-HQ são inibidores de fuso mitótico. Segundo Sharma e Sharma (1980), seu princípio de ação baseia-se na alteração da viscosidade do citoplasma que leva à destruição do mecanismo de formação do fuso, de modo a permitir que os cromossomos fiquem livres e espalhados durante o processo de preparo da lâmina. Além disso, o agente confere aos cromossomos um grau de condensação adequado à manutenção de morfologia nítida. A ciclohexamida, cujos efeitos sobre a mitose foram registrados por Wilson (1950), inibe a síntese protéica em eucariotos e, particularmente em cana-de-açúcar, provoca a contração dos cromossomos tanto em prófase como em metáfase (Tlaskal, 1980). Essa característica é especialmente vantajosa para espécies com grande número de cromossomos, pois na prófase o fuso ainda não está perfeitamente organizado, permitindo melhor dispersão dos cromossomos.

A condição de hidrólise em cana-de-açúcar mais adequada, aqui estabelecida, mediante digestão enzimática com celulase (Sigma) a 2% e com pectinase (Sigma) a 20%, a 37°C, durante 1 a 3 h, coincide com a sugerida em protocolos de preparação cromossômica rotineiros em diversas espécies (Guerra, 2002). Nesta etapa objetiva-se o rompimento da parede celular de forma a propiciar condições adequadas para o espalhamento cromossômico (Guerra, 2002). Além de possibilitar a contagem cromossômica, ou se chegar ao número mais preciso possível (devido à grande quantidade de cromossomos em cana-de-açúcar), essa etapa da técnica é fundamental para o sucesso da aplicação da técnica de hibridização de DNA *in situ* (Guerra, 2004).

4.2 Caracterização cromossômica das espécies *S. officinarum* e *S. spontaneum*

O número modal cromossômico encontrado para a espécie *S. officinarum* foi $2n = 80$, confirmando o número já descrito para essa espécie e assim sua identidade (Bremer, 1923 e

D'Hont *et al.*, 1998) (Fig.20). Já para a espécie *S. spontaneum*, que apresenta citótipos com variações de $2n = 40-128$ (Roach e Daniels, 1987), confirmamos que o citótipo presente no banco de germoplasma em questão possui $2n = 64$ como número mais frequente, tendo o mesmo número cromossômico que o citótipo Coimbatore amplamente utilizado no início dos cruzamentos para o melhoramento genético de cana-de-açúcar (Fig. 21). As amplitudes encontradas nesses resultados foram $h = 4$ para *S. officinarum*, com variações de 76 a 80 cromossomos e de $h = 6$ para *S. spontaneum*, com variações de 61 a 67 cromossomos. As médias encontradas para ambas as espécies, considerando-se o desvio padrão, corrobora com a moda. No entanto, observamos para ambas as espécies o valor da média menor do que o valor da moda, o que poderia facilmente ser explicado considerando-se a técnica de contagem cromossômica. Nas variações encontradas durante uma contagem cromossômica a mais comum é a sobreposição de cromossomos, variação esta que ocasiona na não contagem de todos os cromossomos, fazendo com que o número observado seja menor do que o esperado. Os coeficientes de variação apresentaram-se próximos indicando variações similares nas duas análises. Considerando todos os parâmetros analisados, serão utilizados os valores da moda como $2n$ de cada variedade.

Todas as contagens obtidas podem ser visualizadas nos gráficos da figura 19 e todos os parâmetros das contagens cromossômicas estão descritos resumidamente na tabela 3.

Tabela 3. Números cromossômicos em espécies e variedades de cana-de-açúcar.

Variedade	Moda (mo)	Amplitude (h)	Média (x)	Desvio padrão (σ)	Coefficiente variação
<i>S. spontaneum</i>	64	6 (61-67)	63,87	1,57	2,47%
<i>S. officinarum</i>	80	4 (76-80)	78,71	1,49	1,89%
RB72454	112	8 (108-114)	111,60	1,57	1,40%
RB835486	112	15 (101-116)	109,76	4,20	3,82%
RB867515	110	9 (105-114)	110,35	2,37	2,14%

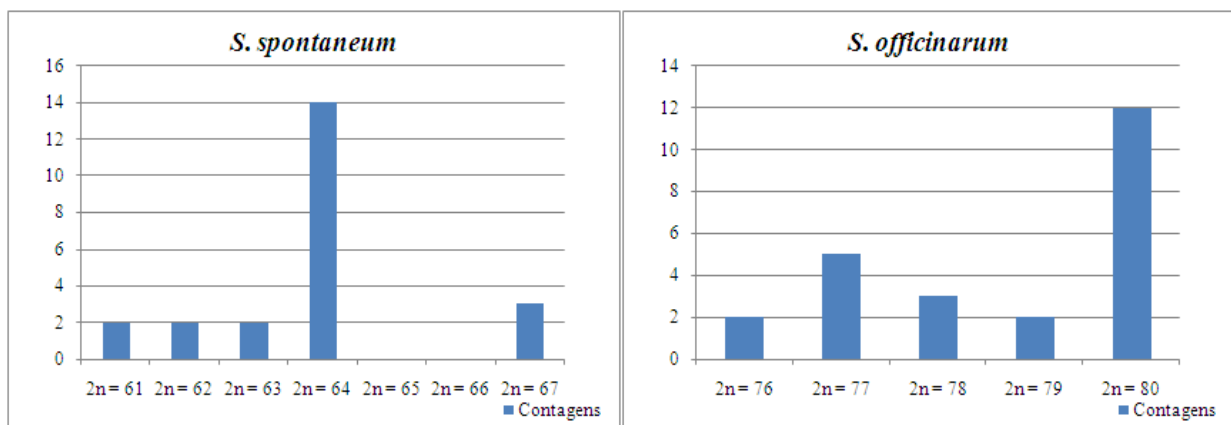


Figura 19. Contagens cromossômicas obtidas para as espécies *S. spontaneum* e *S. officinarum*.

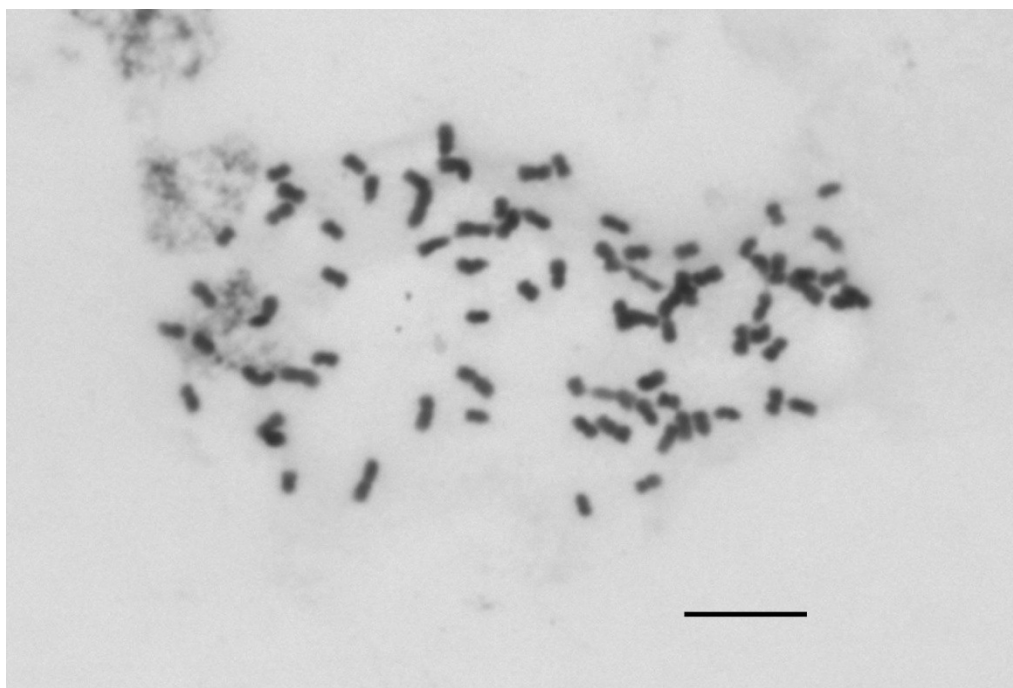


Figura 20. Cromossomos em metáfase mitótica da espécie *Saccharum officinarum* ($2n = 80$) Barra = 10 μ m.

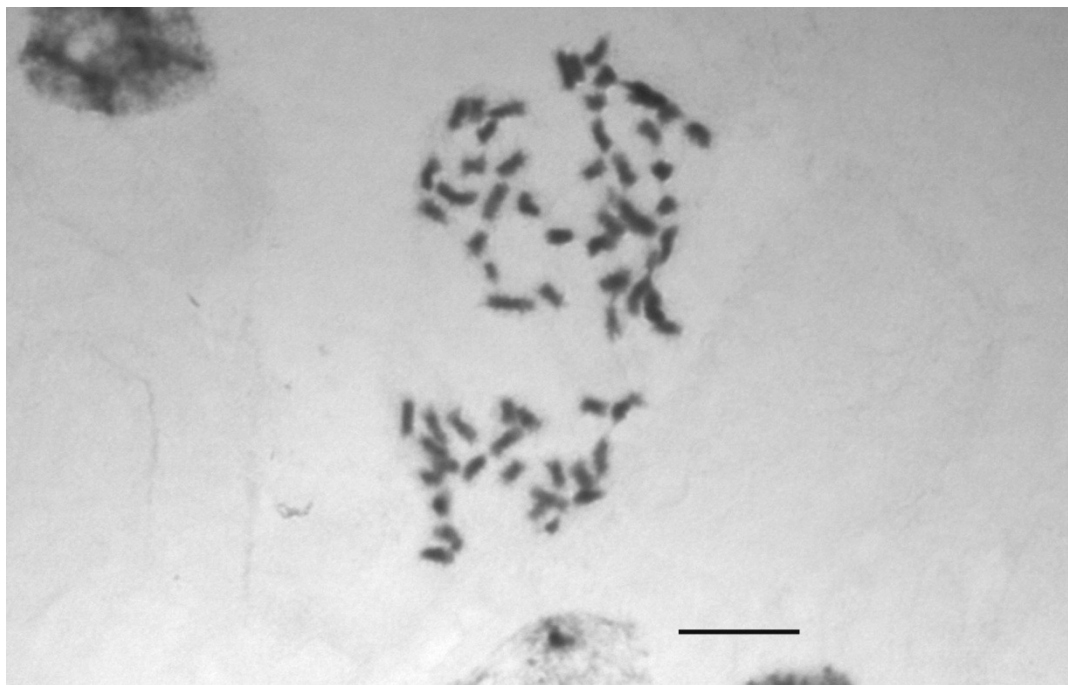


Figura 21. Cromossomos em metáfase mitótica da espécie *Saccharum spontaneum* ($2n = 64$). Barra = $10\mu\text{m}$.

Quanto ao tamanho dos cromossomos observou-se uma variação de $1,2$ a $3,2\mu\text{m}$ na espécie *S. officinarum* e de $1,3$ a $3,8\mu\text{m}$ na espécie *S. spontaneum*. Ha *et al.*, (1999) estudaram os cromossomos de *S. spontaneum* e relata variação de tamanho de 1 a $3\mu\text{m}$, muito similar a encontrada neste estudo. Quanto à posição dos centrômeros os cromossomos nessas espécies, estes apresentam-se em sua maioria metacêntricos e submetacêntricos, dados que também corroboram com o ideograma construído para *S. spontaneum* (Ha *et al.*, 1999).

S. officinarum ($2n = 80$) e *S. spontaneum* Coimbatore ($2n = 64$) estão presentes na base genealógica de todas as variedades modernas de cana-de-açúcar (Peixoto, 1988). Atualmente os programas de melhoramento de cana-de-açúcar têm adotado a estratégia de refazer os primeiros cruzamentos, realizados no início do século XX, entre *S. officinarum* e *S. spontaneum*, dessa vez direcionando o processo de seleção para características relacionadas com o aumento de biomassa.

Por este motivo, a importância de se identificar corretamente os acessos descritos como sendo as espécies *S. officinarum* e *S. spontaneum*. Baseado em dados já descritos na literatura, o número de cromossomos é uma das ferramentas disponíveis para essa identificação. Com os números cromossômicos obtidos confirmou-se que os acessos aqui estudados são representantes das espécies *S. officinarum* ($2n = 80$) e *S. spontaneum* ($2n = 64$), conforme o esperado.

4.3 Caracterização cromossômica das atuais variedades de cana-de-açúcar

Atualmente, as variedades RB72454, RB835486, RB867515 estão entre as cinco variedades mais importantes para a cultura canavieira no Brasil. Hoje, juntas, ocupam 32,8% da área cultivada no Brasil. Além disso, essas variedades fazem parte das bases de progenitores dos atuais programas de melhoramento de cana-de-açúcar no Brasil.

Foram obtidos como número modal $2n = 112$ para a RB72454 e RB835486 (Fig. 22 e 23, respectivamente) e $2n = 110$ para a RB867515 (Fig. 24). Os parâmetros amplitude, média, desvio padrão e coeficiente de variação para cada análise estão descritos na tabela 3. Mais uma vez foi observado para as variedades RB72454 e RB835486 valores da média menores do que a moda e esse fato justifica-se pelas dificuldades na contagem de todos os cromossomos, devido as sobreposições cromossômicas. De qualquer forma, considerando-se os valores de desvio padrão calculados os valores das médias corroboram com os valores das modas. As variações encontradas nos resultados, demonstradas pela amplitude e coeficiente de variação, são justificáveis para a técnica aqui utilizada. Todas as contagens cromossômicas obtidas podem ser visualizadas nos gráficos da figura 25.

Os cromossomos apresentam-se, em sua maioria, metacêntricos e submetacêntricos com tamanhos variando de 1,3 a 4,1 μ m. A variedade RB72454 possui cromossomos de 1,5 a 3,8 μ m, a variedade RB835486 de 1,8 a 3,8 μ m enquanto que a variedade RB867515 possui seus cromossomos variando de 1,3 a 4,1 μ m. Relatos da literatura a respeito de tamanho dos cromossomos de cana-de-açúcar indicam uma variação de 1 a 3 μ m para a espécie *S. spontaneum* (Ha *et al.*, 1999).

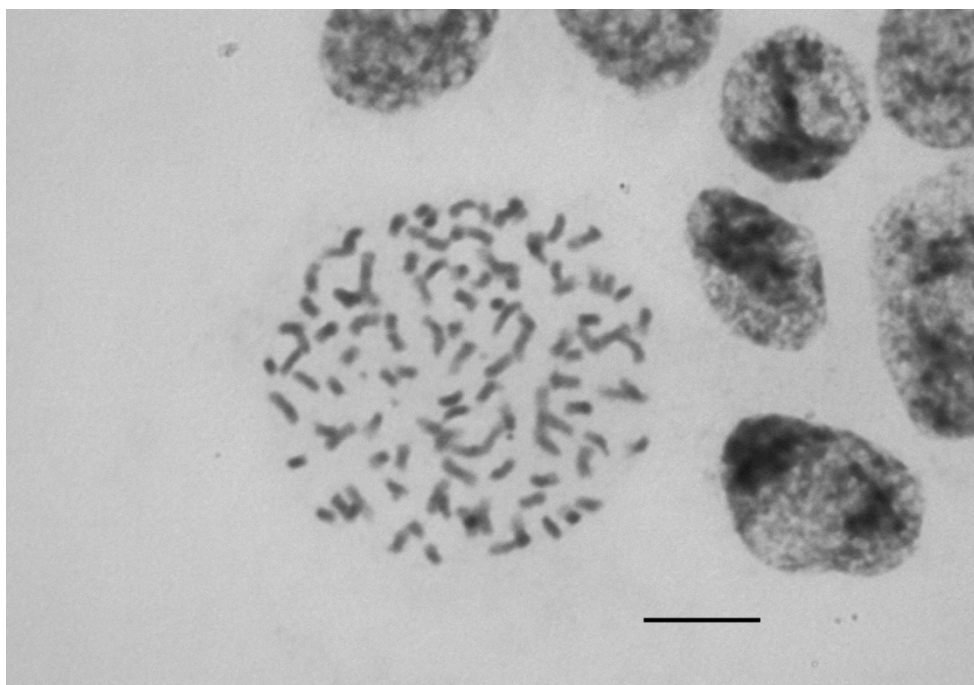


Figura 22. Cromossomos em pró-metáfase mitótica da variedade de *Saccharum*, RB72454 ($2n = 112$). Barra = $10\mu\text{m}$.

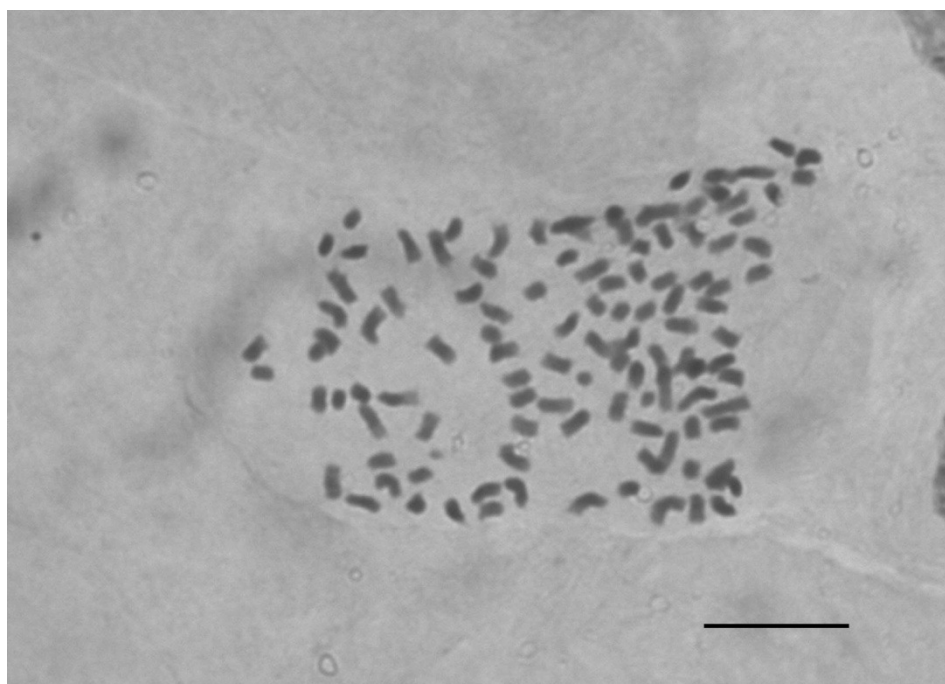


Figura 23. Cromossomos em metáfase mitótica da variedade de *Saccharum*, RB835486 ($2n = 112$). Barra = $10\mu\text{m}$.

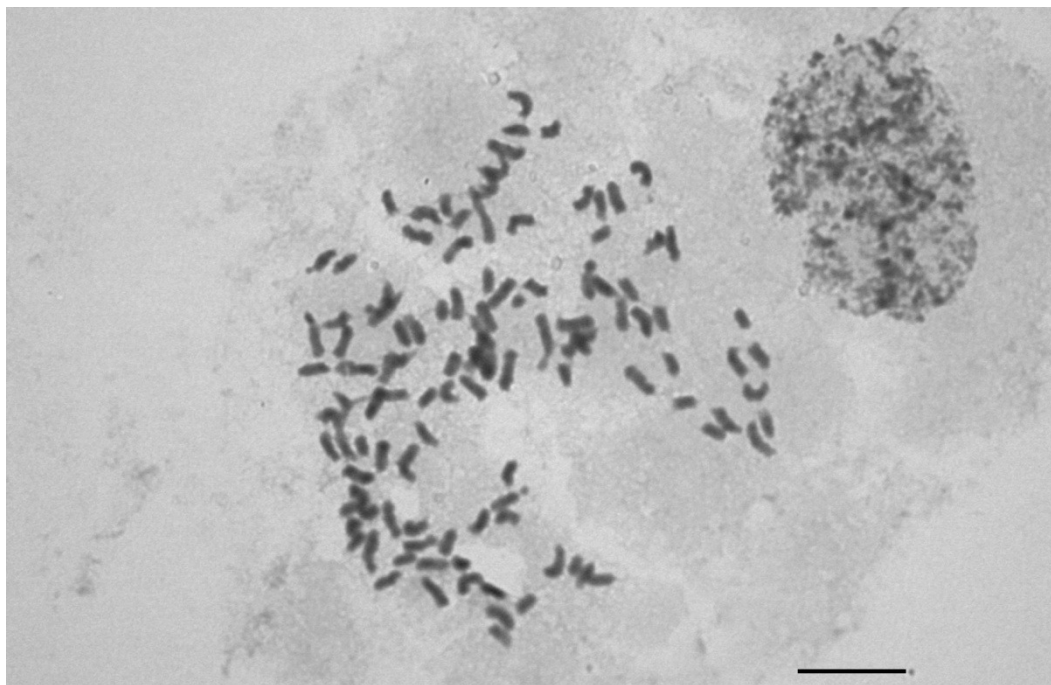


Figura 24. Cromossomos em metáfase mitótica da variedade de *Saccharum*, RB867515 ($2n = 110$). Barra = 10 μ m.

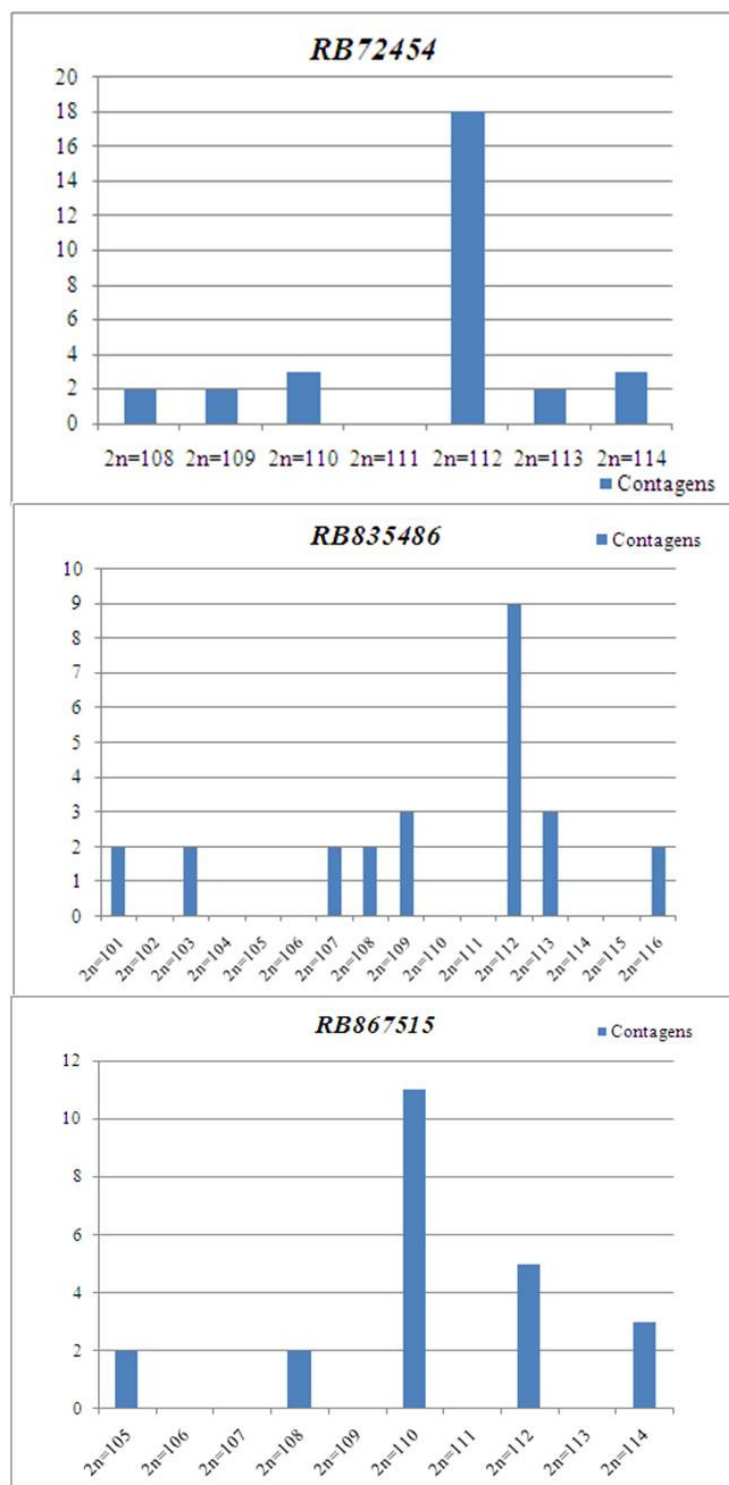


Figura 25. Contagens cromossômicas obtidas para as variedades RB72454, RB835486 e RB867515.

Variedades modernas de cana-de-açúcar possuem $2n = 100$ a 130 cromossomos e são provenientes de cruzamentos interespecíficos, realizados no início do século XX, entre *S.*

officinarum e *S. spontaneum* (D'Hont *et al.*, 1996). As primeiras variedades híbridas com números cromossômicos determinados foram variedades POJ e Co, com números variando entre 115 e 124 cromossomos (Barreto e Simon, 1982). Jenkin *et al.*, (1995) quantificaram os números cromossômicos para a MQ66-14 e 85N904 e obtiveram $2n = 112$ e $2n = 110$, respectivamente. Outra variedade amplamente estudada foi a R570 ($2n = 107-115$), não só em estudos citogenéticos mas também em estudos genéticos, envolvendo marcadores moleculares (D'Hont *et al.*, 1996). Cuadrado *et al.* (2004) caracterizaram o número cromossômico de mais três variedades, My5514 ($2n \sim 103$), B42231 ($2n \sim 110$) e C236-51 ($2n \sim 115$). Variedades utilizadas pelo setor sucroalcooleiro brasileiro foram caracterizadas por Kunieda *et al.* (1984), IAC4865 ($2n = 118$) e por Silvarolla *et al.* (1994), NA56-79 ($2n = 114$) e Co419 ($2n = 113$). No entanto, somente a IAC4865 é uma variedade brasileira, sendo a NA56-79 uma variedade argentina e a Co419 proveniente do programa de melhoramento de Coimbatore/Índia. Com as caracterizações aqui apresentadas ampliam-se os dados referentes às variedades brasileiras, de uma para quatro variedades caracterizadas. Variedades brasileiras de cana-de-açúcar caracterizadas até o momento possuem de 110 a 118 cromossomos.

Tabela 4. Números cromossômicos descritos para variedades de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.).

Variedade	Número cromossômico	Referência
POJ 2878	2n = 117-124	Barreto e Simon, 1982
POJ 2725	2n = 92-108	Barreto e Simon, 1982
Co281	2n = 115	Barreto e Simon, 1982
MQ66-14	2n = 112	Jenkin <i>et al.</i> , 1995
85N904	2n = 110	Jenkin <i>et al.</i> , 1995
R570	2n = 107-115	D'Hont <i>et al.</i> , 1996
My5514	2n ~ 103	Cuadrado <i>et al.</i> , 2004
B42231	2n ~ 110	Cuadrado <i>et al.</i> , 2004
C236-51	2n ~ 115	Cuadrado <i>et al.</i> , 2004
IAC4865	2n = 118	Kunieda <i>et al.</i> , 1984
NA56-79	2n = 114	Silvarolla <i>et al.</i> , 1994
Co419	2n = 113	Silvarolla <i>et al.</i> , 1994
SP80-180	2n = 105-106	Oliveira, 2006
SP80-4966	2n = 106-108	Oliveira, 2006
F1 28	2n = 105-107	Oliveira, 2006
F1 44	2n = 104	Oliveira, 2006
RB72454	2n = 112	Neste estudo
RB835486	2n = 112	Neste estudo
RB867515	2n = 110	Neste estudo

4.4 Caracterização dos sítios de DNA ribossomal 45S e 5S nas espécies e variedades híbridas de cana-de-açúcar

Os resultados observados no presente trabalho confirmaram os números de sítios de rDNA 45S e 5S já descritos para *S. officinarum* (2n = 80) e para *S. spontaneum* (2n = 64), apresentando ambas as espécies oito sítios tanto de rDNA 45S quanto de 5S (Fig.26, tabela 5) (D'Hont *et al.*, 1996).

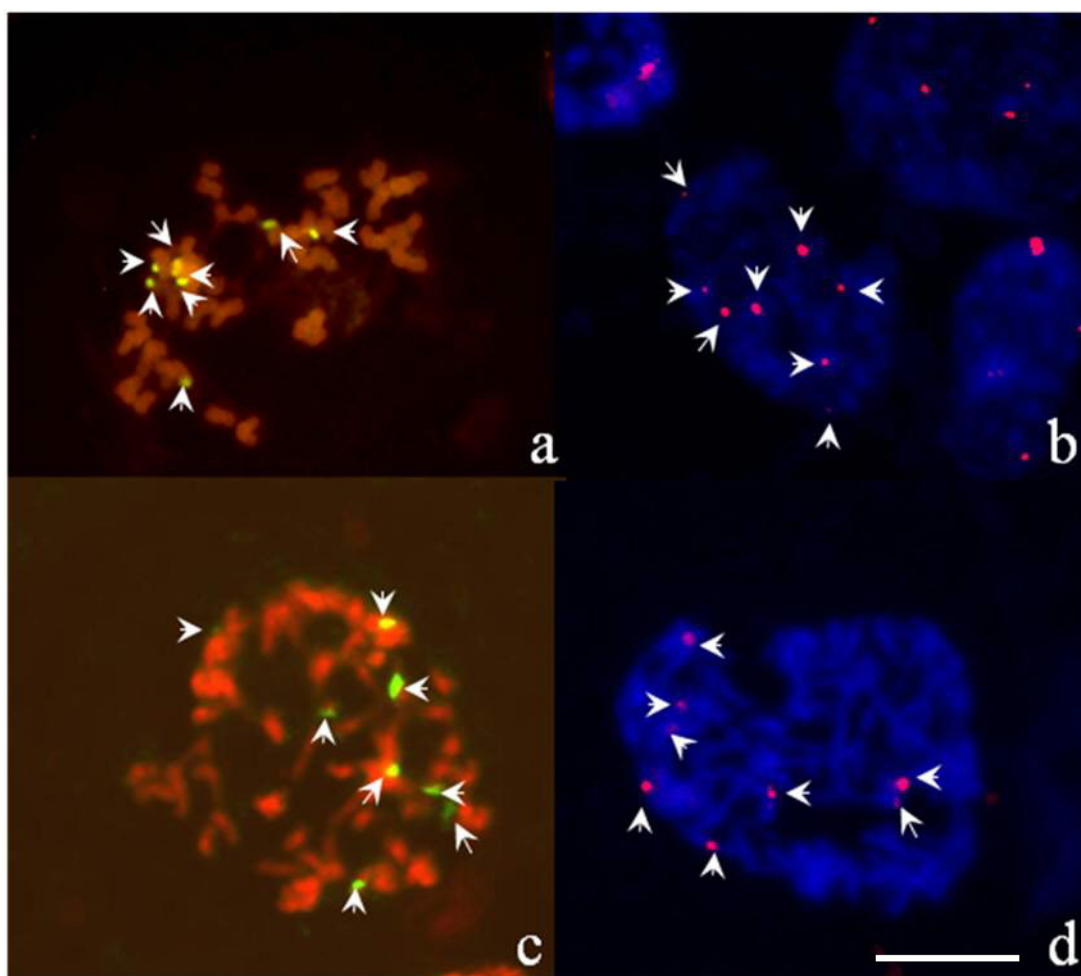


Figura 26. Sítios de rDNA em cromossomos de *S. officinarum* ($2n = 80$) com (a) sonda rDNA 45S marcada com FITC, 8 sítios e (b) sonda rDNA 5S marcada com rodamina, 8 sítios; e *S. spontaneum* ($2n = 64$) com (a) sonda rDNA 45S marcada com FITC, 8 sítios e (b) sonda rDNA 5S marcada com rodamina, 8 sítios. Os cromossomos foram contra-corados com (a e c) iodeto de propídeo e (b e d) DAPI. Todos os sítios estão indicados por setas. Barra = 10 μ m.

As caracterizações dos números de sítios dos genes ribossomais 45S e 5S nas variedades RB72454, RB835486 e RB867515 são inéditas. Foram quantificados 12 sítios de cada gene nas variedades RB72454 (Fig. 27) e RB835486 (Fig.28) ($2n = 112$) e 11 sítios do gene 45S mais 9 sítios do gene 5S na variedade RB867515 (Fig.29) ($2n = 110$). Os dados sugerem que parte da variação do número cromossômico encontrada na variedade RB867515 (possuindo dois cromossomos a menos que as outras variedades estudadas) esteja relacionada aos grupos homó(eó)logos que contêm o gene 45S e/ou 5S, que serão aqui denominados GH45 e GH5. Esses dados poderão ser melhor elucidados quando obtivermos um marcador cromossômico para cada

grupo homó(éo)logo e assim, através de hibridizações *in situ*, compararmos o número de cópias de todos grupos homó(eó)logos em cada variedade. Todos os números obtidos estão descritos na tabela 5.

Tabela 5. Números e características dos sítios rDNA 45S e 5S descritos para espécies e variedades de cana-de-açúcar.

Variedade	2n	Sítios rDNA 45S	Posição dos sítios 45S	Sítios rDNA 5S	Referência
<i>S. spontaneum</i>	2n = 64	8	intersticiais	8	D'Hont <i>et al.</i> , 1996; 1998.
<i>S. officinarum</i>	2n = 80	8	terminais	8	D'Hont <i>et al.</i> , 1996; 1998.
My5514	2n ~ 103	10	-	10	Cuadrado <i>et al.</i> , 2004.
B42231	2n ~ 110	10	-	10	Cuadrado <i>et al.</i> , 2004.
C236-51	2n ~ 115	12	-	12	Cuadrado <i>et al.</i> , 2004.
<i>S. spontaneum</i>	2n = 64	8	-	8	Neste estudo
<i>S. officinarum</i>	2n = 80	8	-	8	Neste estudo
RB72454	2n = 112	12	8 terminais 4 intersticiais	12	Neste estudo
RB835486	2n = 112	12	-	12	Neste estudo
RB867515	2n = 110	11	9 terminais 2 intersticiais	9	Neste estudo

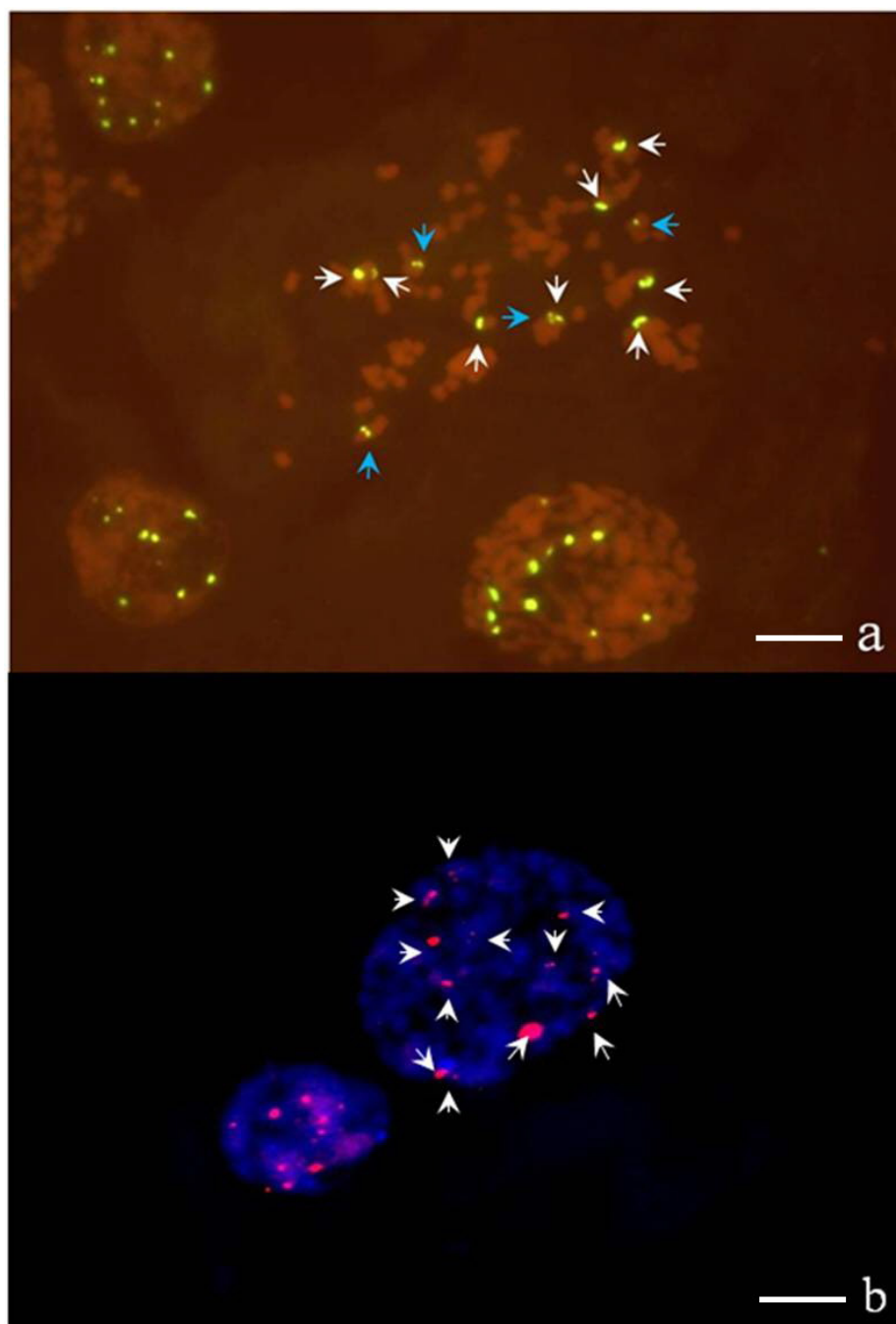


Figura 27. Sítios de rDNA em cromossomos da variedade de *Saccharum* spp., RB72454 ($2n = 112$) (a) sonda rDNA 45S marcada com FITC , 12 sítios e (b) sonda rDNA 5S marcada com rodamina, 12 sítios. Os cromossomos foram contra-corados com (a) iodeto de propídeo e (b) DAPI. Todos os sítios estão indicados por setas. Setas azuis indicam sítios intersticiais. Barra = 10 μ m.

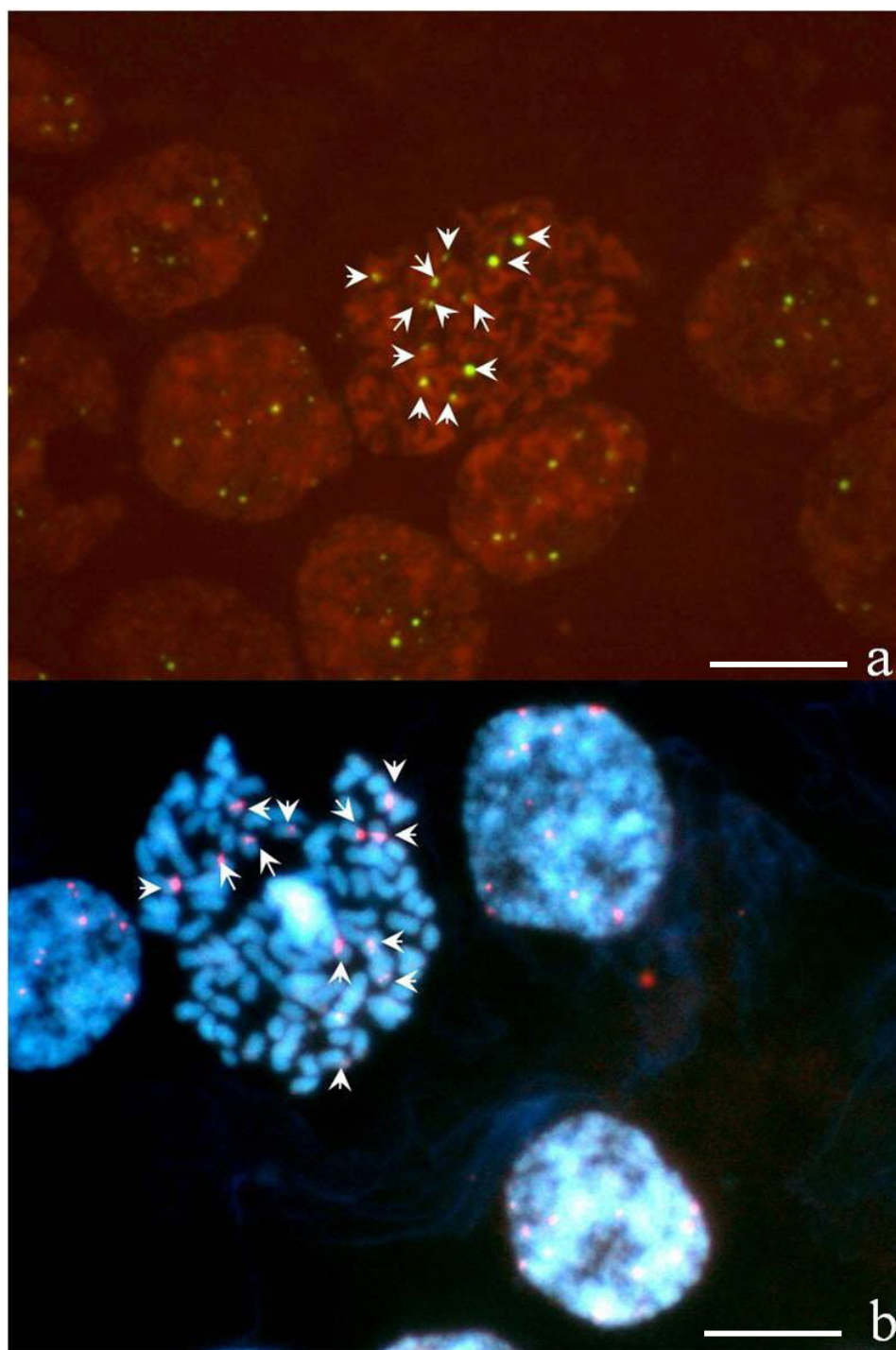


Figura 28. Sítios de rDNA em cromossomos da variedade de *Saccharum* spp., RB835486 ($2n = 112$) (a) sonda rDNA 45S marcada com FITC, 12 sítios e (b) sonda rDNA 5S marcada com rodamina, 12 sítios. Os cromossomos foram contra-corados com (a) iodeto de propídeo e (b) DAPI. Todos os sítios estão indicados por setas brancas. Barra = 10 μ m.

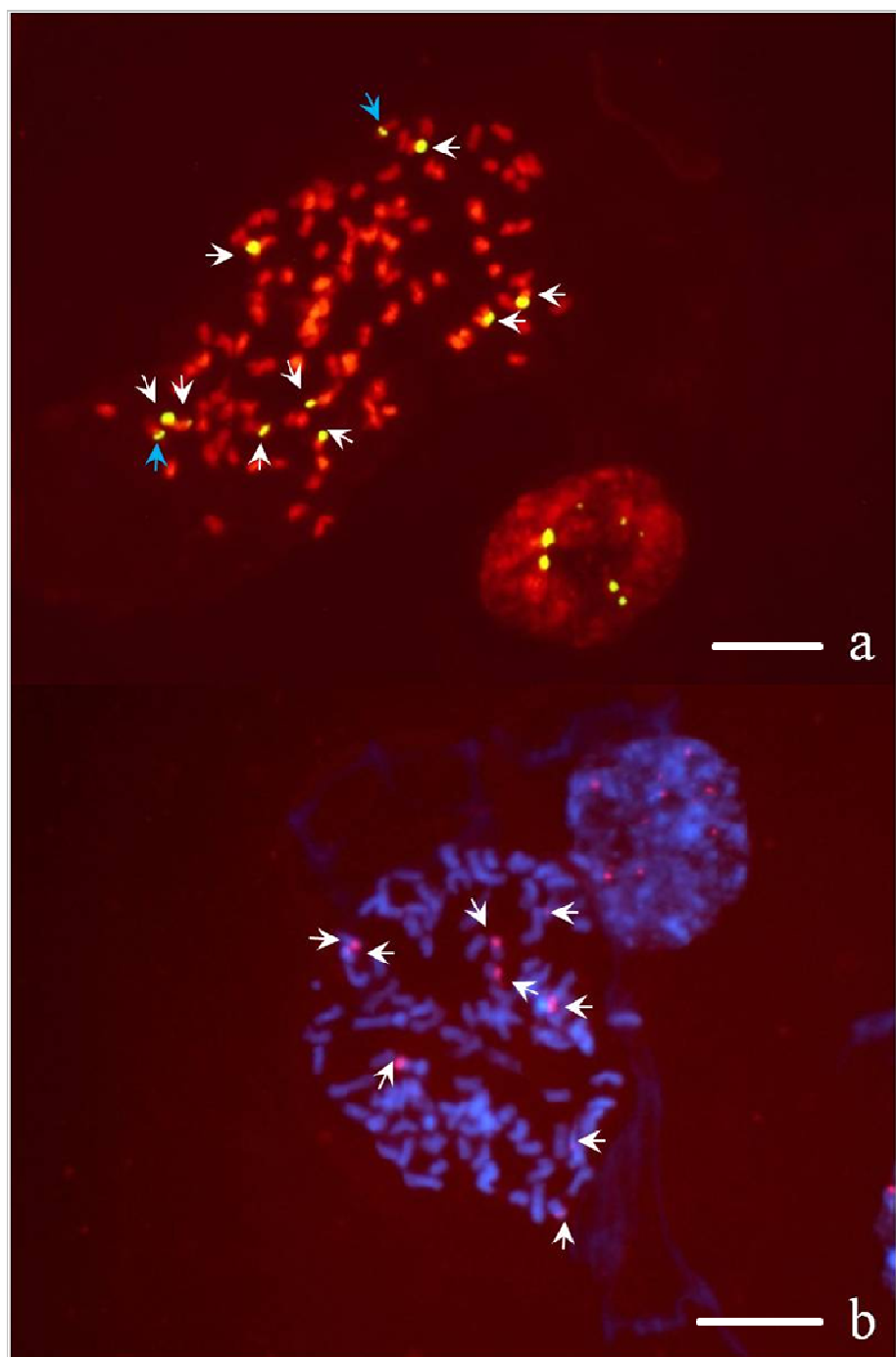


Figura 29. Sítios de rDNA em cromossomos da variedade de *Saccharum* spp., RB867515 ($2n = 112$) (a) sonda rDNA 45S marcada com FITC, 11 sítios e (b) sonda rDNA 5S marcada com rodamina, 9 sítios. Os cromossomos foram contra-corados com (a) iodeto de propídeo e (b) DAPI. Todos os sítios estão indicados por setas. Setas azuis indicam sítios intersticiais. Barra = 10 μ m.

As caracterizações dos sítios de rDNA 45S e 5S foram importantes para a confirmação do número cromossômico básico dentro do gênero *Saccharum*. A interpretação desses números

demonstrou a presença de oito cromossomos homo(eó)logos em *S. officinarum* ($2n = 80$) (oito sítios de rDNA 45S e 5S), indicando um número básico cromossômico $x = 10$ (D'Hont *et al.*, 1996; 1998). Já nos estudos de *S. spontaneum*, esses genes ribossomais estão presentes em oito cópias nos citótipos com $2n = 64$ e em dez cópias nos citótipos possuindo $2n = 80$, indicando $x = 8$ o número básico para esta espécie. Outros dois citótipos de *S. spontaneum* foram estudados por D'Hont *et al.* (1996), possuindo $2n = 96$ e $2n = 112$ cromossomos. Para o citótipo com $2n = 96$, doze cópias de cada gene ribossomal foram detectadas, confirmando o número básico $x=8$. Já no citótipo $2n = 112$, quatorze cópias de rDNA 5S foram localizadas, mas somente dez cópias de rDNA 45S foram identificadas. Esse resultado pode ser atribuído à perda de sítios de rDNA 45S ou mesmo à dificuldade técnica em se observar os sítios, devido ao alto número de cromossomos (D'Hont *et al.*, 1996; 1998). A perda de sítios de rDNA em plantas de origens poliplóides já foi descrita anteriormente em cevada (Linde-Laursen *et al.*, 1992).

Em variedades híbridas, os sítios dos dois tipos de rDNA foram localizados em números parecidos aos obtidos neste trabalho. Cuadrado *et al.* (2004) quantificaram 10 sítios de rDNA 45S e 5S nas variedades My5514 ($2n \sim 103$) e B42231 ($2n \sim 110$), enquanto na C236-51 ($2n \sim 115$) foram constatados 12 sítios cada. Como nos dados obtidos por Cuadrado *et al.* (2004), o número de sítios obtidos para as variedades brasileiras é equivalente para ambos os genes nas variedades RB72454 e RB835486, mas diferentemente apresentam-se em quantidades desiguais na variedade RB867515. A variação do número de sítios entre as variedades com números cromossômicos parecidos também condiz com os dados já descritos (Cuadrado *et al.*, 2004).

Os sítios de rDNA podem ser localizados em regiões próximas, no mesmo cromossomo, como em citros (Brasileiro-Vidal *et al.*, 2007) ou em cromossomos distintos, como em milho (Lijia e Arumuganathan, 2001). Trabalhos anteriores demonstraram para *Saccharum* spp. a presença dos sítios rDNA 45S e rDNA 5S em grupos homo(eó)logos distintos (D'Hont *et al.*, 1996; 1998). Esses resultados foram confirmados em preparações em que fizemos a co-hibridização das sondas 45S e 5S na mesma metáfase. Na figura 30 é visualizada a maior parte dos sítios de rDNA 45S e 5S em uma mesma metáfase, confirmando a sua localização em cromossomos diferentes.

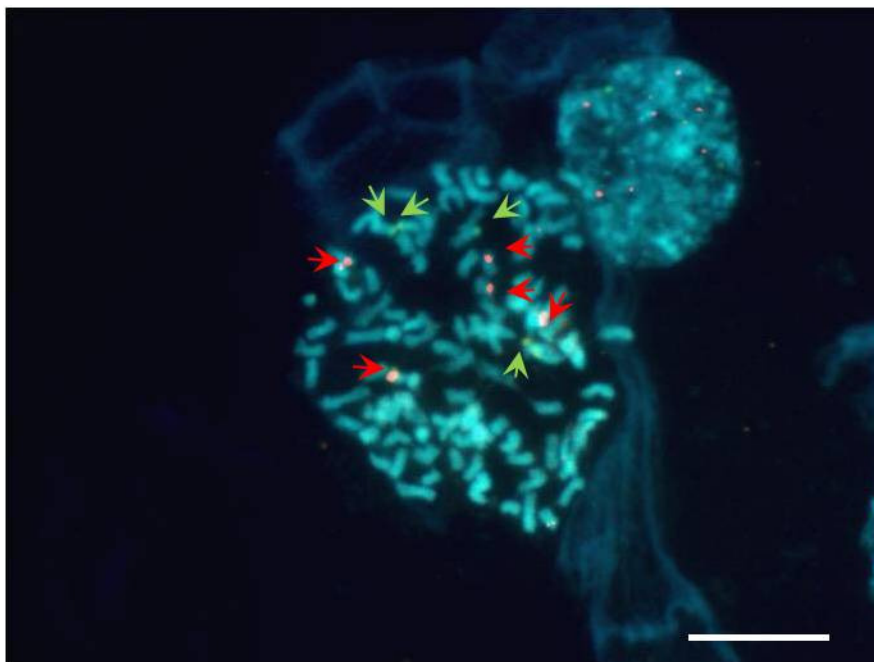


Figura 30. Alguns sítios de rDNA 45S marcados com FITC (verde) e sítios de rDNA 5S marcados com rodamina (vermelho) em metáfase mitótica de *Saccharum* spp. demonstrando a presença desses sítios em cromossomos diferentes. Os cromossomos foram contra-corados com DAPI. Os sítios são indicados em setas verdes (rDNA 45S) e vermelhas (rDNA 5S). Barra = 10µm.

A localização desses genes, 45S e 5S em cromossomos distintos, ou seja, em grupos homó(eó)logos diferentes faz com que estes genes sejam dois marcadores cromossômicos em cana-de-açúcar distinguindo dois grupos homó(eó)logos dos dez existentes.

Em algumas metáfases, além da quantificação dos sítios, foi possível observar detalhes a respeito de suas localizações. Os sítios de rDNA 5S sempre foram observados em posição intersticial. Já os sítios de rDNA 45S puderam ser observados em duas localizações distintas, alguns em posição terminal e outros em posição intersticial. Em duas variedades tivemos condições de quantificar o número de sítios intersticiais e terminais desse *locus*. Na variedade RB867515 foram quantificados nove sítios terminais e dois sítios intersticiais. Na variedade RB72454 observamos oito sítios terminais e quatro sítios intersticiais (tabela 5).

As posições dos *loci* de rDNA já foram mapeadas previamente em cana, especificamente nas espécies *S. officinarum* e *S. spontaneum* (D'Hont *et al.*, 1996; Ha *et al.*, 1999). Conforme o observado neste estudo o gene 5S foi localizado em posição intersticial tanto em *S. officinarum*

como em *S. spontaneum*. Já o *locus* 45S foi observado exclusivamente em posição terminal em *S. officinarum* e sempre na posição intersticial dos cromossomos de *S. spontaneum* (D'Hont *et al.*, 1998; Ha *et al.*, 1999).

Com as informações disponíveis na literatura a respeito da localização diferencial dos sítios de rDNA 45S em *S. officinarum* e *S. spontaneum*, é possível, numa variedade híbrida de cana-de-açúcar contendo cromossomos provenientes de ambas as espécies, distinguir, para este grupo homeólogo, os cromossomos herdados de *S. officinarum* e *S. spontaneum*. A figura 31 esquematiza os cromossomos da variedade RB72454 baseados nos dados observados neste estudo.

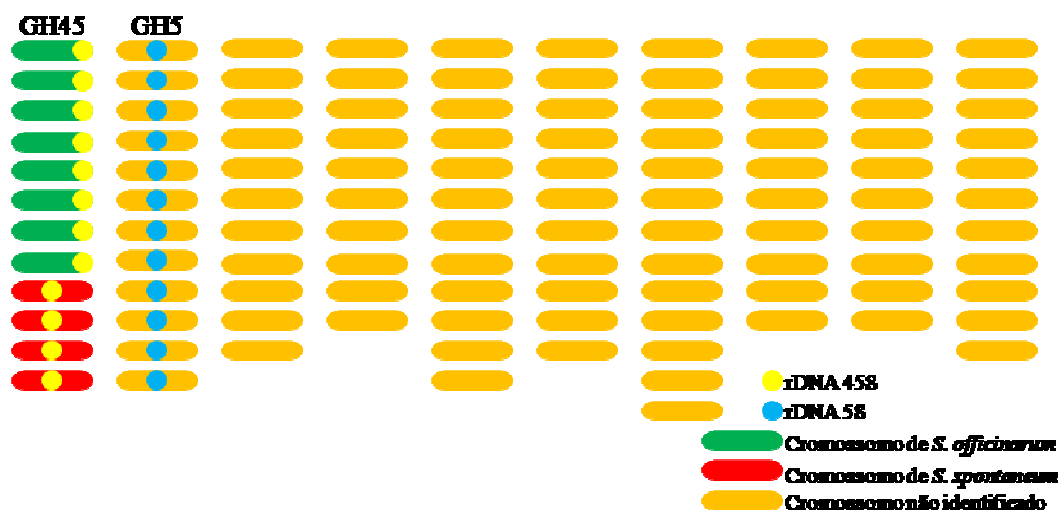


Figura 31. Esquema da organização cromossômica da variedade RB72454 baseada nos dados obtidos neste estudo. Em verde são ilustrados os cromossomos herdados de *S. officinarum*, em vermelho os cromossomos herdados de *S. spontaneum* e em laranja os cromossomos ainda não identificados. GH45 representa o grupo homeólogo que contém o *locus* 45S e GH5 representa o grupo homó(eó)logo que contém o *locus* 5S. Os sítios rDNA 45S são ilustrados em amarelo e em azul, são ilustrados os sítios de rDNA 5S.

Comparando-se os dados obtidos para as variedades RB72454 e RB867515, poderia-se concluir, que para este grupo homeólogo, GH45, a variedade RB72454 possui 8 dos 12 cromossomos totais provenientes de *S. officinarum* sendo os 4 restantes provenientes de *S. spontaneum*, enquanto a variedade RB867515 para esse grupo homeólogo, GH45, possui 9 dos 11 cromossomos totais provenientes de *S. officinarum* e somente 2 do total de 11 cromossomos

provenientes de *S. spontaneum*. Essa seria a hipótese mais simples que ignora a possibilidade de ter ocorrido recombinações, translocações cromossômicas, ou mesmo a perda de sítios ribossomais. Se confirmada a hipótese acima seria possível dizer que para o grupo homeólogo, GH45, a RB72454 tem maior representatividade de DNA de *S. spontaneum* quando comparada com a variedade RB867515, conseqüentemente, a variedade RB867515, para o GH45, quando comparada com a RB72454, possui maior representatividade de DNA de *S. officinarum*. Esses dados são iniciais e expressam a composição de apenas um grupo homó(eó)logo dos dez presentes nas variedades atuais de cana-de-açúcar. Entretanto, comparações e discussões futuras desse tipo poderão ser melhor elaboradas quando estiverem disponibilizados outros marcadores cromossômicos para mapeamento de todo esse genoma.

Possuir ferramentas que permitam quantificar o número de cópias de cromossomos em cada grupo homó(eó)logo, estabelecer marcas que orientem a localização de seqüências específicas, elementos repetitivos ou transgenes e compreender melhor a contribuição dos genomas de *S. officinarum* e *S. spontaneum* em cada variedade significará entender melhor a complexa organização genômica das variedades de cana-de-açúcar e apoiar estratégias inovadoras do melhoramento genético dessa cultura.

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Foi possível padronizar protocolos para estudos citogenéticos de *Saccharum* spp., superando algumas dificuldades técnicas inerentes ao material específico com cromossomos numerosos e pequenos.

Foram quantificados os cromossomos das duas principais espécies do gênero que hoje voltam a ser utilizadas por programas de melhoramento genético de cana-de-açúcar. *S. officinarum* ($2n = 80$) e *S. spontaneum* ($2n = 64$), ambas com o número cromossômico esperado.

Foram quantificados os cromossomos de três importantes variedades brasileiras RB762454 ($2n=112$), RB835486 ($2n=112$) e RB867515 ($2n=110$) e dessa forma obtiveram-se suas primeiras caracterizações cromossômicas.

Foram caracterizados e quantificados dois marcadores cromossômicos, os genes rDNA 45S e 5S, localizados em dois grupos homó(eó)logos diferentes, aqui denominados GH45 e GH5.

Objetivando-se a construção de um mapa citogenético para cana-de-açúcar, no qual todos os grupos homó(eó)logos poderão ser localizados, quantificados e caracterizados foram realizadas neste estudo as primeiras etapas desse projeto.

Para a construção do mapa citogenético no qual todos os grupo homó(eó)logos possam ser identificados e passíveis de quantificação, serão mapeados, no mínimo, mais oito marcadores distribuídos uniformemente pelo genoma de cana-de-açúcar. Este trabalho foi iniciado com o mapeamento de marcadores ribossômicos, mais facilmente detectados citologicamente. As próximas etapas envolverão a identificação de marcadores tipo BAC (*Bacterial Artificial Chromosome*), que atendam nossas necessidades.

6. BIBLIOGRAFIA

- Allard, R.W. (1960). Backcross breeding. In: (Allard, R.W) (Ed.). *Principles of plant breeding*. New York: John Wiley and Sons.
- Arceneaux, G. (1967). Cultivated sugarcane of the world and their botanical derivation. *Proceedings of the International Society of Sugar Cane Technologists* 12: 844-854.
- Arizono, H.; Gheller, A.C.A.; Masuda, Y.; Hoffmann, H.P.; Bassinello, A.I.; Gigliotti, E.A.; Menezes, L.L.; Matsuoka, S. (2000). *Guia das principais variedades de cana-de-açúcar*. Universidade Federal de São Carlos.
- Artscchwager, E.; Brandes, E.W. (1958) Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.): origin, classification, characteristics, and descriptions of representative clones. *Agriculture Handbook N°122*. Washington: Agricultural Research Service, Crops Research Division.
- Annual Energy Outlook (2008). www.eia.doe.gov/oiaf/aeo/. Acessado em 10/07/2008.
- Badger, P. C. (2002). Ethanol from cellulose: a general review. In: Janick, J.; Whipkey, A. (Ed.). *Trends in new crops and new uses* Alexandria, VA: ASHS Press.
- Barber, C.A. (1920). The origin of sugarcane. *International Sugar Journal* 22.
- Barreto, A. Simons, J.P. (1982). Identification de progenies Y progenitors por el analisis del numero cromosomico en *Saccharum. Turrialba* 32: 169-180.
- Bernet, G.P; Bramardi, S.; Calvache, D.; Carbonell, E.A.; Asins, M.J. (2003). Applicability of molecular markers in the context of protection of new varieties of cucumber. *Plant Breeding* 122: 146-152.

- Boyle, R.; Greenwood, C.; Hohler, A.; Liebreich, M.; Sonntag-O'Brien, V.; Tyne, A. and Usher, E. (2008). Global Trends in Sustainable Energy Investment 2008 Report. United Nations Foundation.
http://sefi.unep.org/fileadmin/media/sefi/docs/publications/Global_Trends_2008.pdf. Acesso em 28/07/2008.
- Brandes, E. W. (1956). Origin, dispersal and use in breeding of the Melanesian garden sugarcane and their derivate, *S. officinarum* L. *Proceeding of the International Society of Sugar Cane Technologists* 9.
- Brasileiro-Vidal, A.C.; Santos-Serejo, J.A.; S. Soares Filho, W.; Guerra, M. (2007). A simple chromosomal marker can reliably distinguishes *Poncirus* from *Citrus* species. *Genetica* 129: 273-279.
- Bremer, G. (1923). A cytological investigation of some species and species hybrids within the genus *Saccharum*. *Genetica* 5: 97-148.
- Bremer, G. (1963). Problems in breeding and cytology of sugarcane. VI. Additional contemplations on fertilization and parthenogenesis in *Saccharum*. *Euphytica* 12: 178-188.
- Bremer, G. (1961). Problems in breeding and cytology of sugarcane. IV. The origin of the increase of chromosome number in species hybrids of *Saccharum*. *Euphytica* 10: 325-342.
- Bremer, G. (1959). Increase of chromosome numbers in species hybrids of *Saccharum* in relation to the embryo-sac development. *Bibliography of Genetics* 18: 1-99.
- Buongiorno-Nardelli, M.; Amaldi, F.. (1969). Autoradiographic detection of molecular hybrids between rRNA and DNA in tissue sections. *Nature* 225: 946-947.
- Burner, D.M.; Beijamin, L.L. (1993). Chromosome transmission and meiotic stability of sugarcane (*Saccharum* spp.) hybrid derivatives. *Crop Science* 33: 600-606.

- Burner, D.M. (1991). Cytogenetic analyses of sugarcane relatives (Andropogoneae: Saccharinae). *Euphytica* 54: 125-133.
- Cheng, Z.; Presting, G.G.; Buell C.R.; Wing, R.A.; Jiang, J. (2001). High-resolution pachytene chromosome mapping of bacterial artificial chromosomes anchored by genetic markers reveals the centromere location and the distribution of genetic recombination along chromosome 10 of rice. *Genetics* 157: 1749-1757.
- Cox, A.V.; Bennett M.D.; Dyer, T.A. (1992). Use of the polymerase chain reaction to detect spacer size heterogeneity in plant 5S-rRNA gene clusters and to locate such clusters in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 83: 684–690.
- Cuadrado, A.; Acevedo, R.; Moreno Diaz de la Espina, S.; Jouve, N.; de la Torre, C. (2004). Genome remodelling in three modern *S. officinarum* x *S. spontaneum* sugarcane cultivars. *Journal of Experimental Botany* 55: 847-54.
- Daniels, J.; Smith, P.; Paton, N.; Williams, C.A. (1975). The origin of the genus *Saccharum*. *Sugarcane Breeding Newsletter* 36: 24-39.
- Daniels, J.; Roach, B.T. (1987). Taxonomy and evolution in sugarcane. In: Heinz, D.J. (Ed.). *Sugarcane Improvement through Breeding*, Amsterdam: Elsevier Press.
- Demirbas, A. (2001). Biomass resource facilities and biomass conversion processing for fuels and chemicals. *Energy Conversion and Management* 42: 1357-1378.
- D'Hont, A.; Grivet, L.; Feldman, P.; Rao, S.; Berding, N.; Glaszmann, J.C. (1996). Characterization of the double genome structure of modern sugarcane cultivars (*Saccharum* spp.) by molecular genetics. *Molecular and General Genetics* 250: 405-413.

- D'Hont, A.; Ison, D.; Alix, K.; Rolix, C.; Glaszmann, J.C. (1998). Determination of basic chromosome numbers in the genus *Saccharum* by physical mapping of ribosomal RNA genes. *Genome* 41: 221-225.
- D'Hont, A.; Rao, S.; , P.; Grivet, L.; Islam-Faridi, N.; Berding, N.; Glaszman J.C. (1995). Identification and characterization of intergeneric hybrids, *Saccharum officinarum* × *Erianthus arundinaceus*, with molecular markers and in situ hybridisation. *Theoretical and Applied Genetics* 91: 320–326.
- D'Hont, A.; Paulet, F.; Glaszmann, J.C. (2002). Oligoclonal interspecific origin of North Indian and Chinese sugarcanes. *Chromosome Research* 10: 253-262.
- Dillon, S.L.; Shapter, F.M.; Robert, H.J.; Cordeiro, G.; Izquierdo, L.; Lee, S.L. (2007). Domestication to crop improvement: genetic resources for Sorghum and Saccharum (Andropogoneae). *Annals of Botany* 5: 975-989.
- Earle, F. S. (1919). The resistance of cane varieties to the yellow stripe or mosaic disease. *Insular Experimental Station Puerto Rico, Bulletin*, 19.
- English, B.C.; Menard, J.R.; Ugarte, D.T.; Walsh, M. (2005). Economic impacts of ethanol production from maize stover in selected midwestern states. In: *Outlaw, J. (Ed.). Agriculture as a Producer and Consumer of Energy*. Knoxville: CABI Publishing.
- Figueiredo, P. (2008) Breve história da cana-de-açúcar e do papel do instituto agrônômico no seu estabelecimento no Brasil. In: Dinardo-Miranda, L.L; Vasconcelos, A.C.M.; Landell, M.G.A. (Ed.). *Cana-de-açúcar*. Ribeirão Preto: IAC.
- Gall, J.; Pardue, M. L. (1969). Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proceedings of National Academy of Sciences* 63: 378-383.

- Gerlach, W.L.; Bedbrook, J.R. (1979). Cloning and characterization of ribosomal RNA genes from wheat and barley. *Nucleic Acids Research* 7: 1869-1885.
- Grassl, C.O. (1964). Problems relative to the origin and evolution of wild and cultivated *Saccharum*. *Indian Journal of Sugarcane Research and Development* 8: 106-116.
- Grivet, L.; Glaszmann, J.C.; D'Hont, A. (2006). Molecular evidence of sugarcane evolution and domestication. In: Motley, T.J.; Zerega, N.; Cross, H. *Darwin's harvest: New approaches to the origins, evolution, and conservation of crops*. New York: Columbia University Press.
- Grivet, L.; D'Hont, A.; Roques, D.; Feldmann, P.; Lanaud, C.; Glaszmann, J.C. (1996). RFLP mapping in cultivated sugarcane (*Saccharum* spp.): Genome organization in a highly polyploid and aneuploid interspecific hybrid. *Genetics* 142: 987-1000.
- Guerra, M. (2005). What is new in plant cytogenetics? *Genetics and Molecular Biology* 28: 444-445.
- Guerra, M. (2004). *FISH Conceitos e Aplicações na Citogenética*.
- Guerra, M.; Souza, M. J. (2002). *Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana*.
- Gupta, P.K.; Kulwal, P.L.; Rustgi, S. (2005). Wheat cytogenetics in the genomics era and its relevance to breeding. *Cytogenetic and Genome Research* 109: 315-327.
- Ha, S.; Moore, P.H.; Heinz, D.J.; Kato, S.; Ohmido, N.; Fukui, K. (1999). Quantitative chromosome map of the polyploid *Saccharum spontaneum* by multicolor fluorescence in situ hybridization and imaging methods. *Plant Molecular Biology* 39:1165-73. Erratum in: *Plant Molecular Biology* 41: 293.

- Hitchcock, A.S. (1923). Type species of the first 100 genera of Linnaeus "Species Plantarum". *Botanical Society of America* 510-517.
- James, G.L. (2004). An introduction to sugarcane. In: (James, G.L.) (Ed.). *Sugarcane*. Oxford: Blackwell Publishing.
- Jenkin, M.J.; Reader, S.M.; Purdie, K.A.; Miller, T.E. (1995). Detection of rDNA sites in sugarcane by FISH. *Chromosome Research* 3: 444-5.
- Jong, H.J.; Fransz, P.; Zabel, P. (1999). High resolution FISH in plants – techniques and applications. *Trend Plant Science* 4: 258-263.
- Kandasami P.A. 1978. Cytogenetical studies of interspecific and intraspecific hybrids of *Saccharum Process*. *ISSCT Congress* 16: 251-263 .
- Kandasami, P.A.; Sreenivasan, T.V. (1983). Catalogue *Saccharum spontaneum* L. Coimbatore: ICAR.
- Kato, A.; Jonathan, C.L.; Birchler, J.A. (2004). Chromosome painting using repetitive DNA sequences as probes for somatic chromosome identification in maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101: 13554-13559.
- Kunieda, M.K.; Aguiar-Perecin, M.L.R.de; Bassinelo, A.I. (1984). Caracterização do número de cromossomos de duas variedades de cana-de-açúcar cultivada no Brasil. In: *I Colóquio sobre Citogenética e Evolução de Plantas, Piracicaba - SP - Brazil*. -Departamento de Genética 46-46.
- Landell, M.G.A.; Bressiani, J.A. (2008). Melhoramento genético, caracterização e manejo varietal. In: Dinardo-Miranda, L.L; Vasconcelos, A.C.M.; Landell, M.G.A. (Ed.). *Cana-de-açúcar*. Ribeirão Preto: IAC.

- Lijia, L.I.; Arumuganathan, K. (2001). Physical mapping of sorted chromosomes 45S and 5S rDNA on maize metaphase and by FISH. *Hereditas* 134: 141-145.
- Linde-Laursen, I.; Isben, E.; Von Bothmer, R.; Giese, H. (1992). Physical localization of active and inactive rRNA gene loci in *Hordeum marinum* spp. *gussoneanum* (4x) by in situ hybridization. *Genome* 35: 1032-1036.
- Ming, R.; Moore, P.H.; Wu, K.; D'Hont, A.; Glazmann, J.C.; Tew, T.L.; Mirkov, T.E.; da Silva, J.; Jifon, J.; Rai, M.; Schnell, R.J.; Brumbley, S.M.; Lakshmanan, P.; Comstock, J.C. and Paterson, A.H. (2006). Sugarcane improvement through breeding and biotechnology. *Plant Breeding Reviews* 27: 15-118.
- Mongelard, J.E. (1968). The effect of different water regimes on the growth of two sugar cane varieties. *International Society Sugar Technologists, Prod. 13th. Congress* 643-651.
- Moreira, J. C. (2000). Sugarcane for energy: recent results and progress in Brazil. *Energy for Sustainable Development* 4: 43-54.
- Mukherjee, S.K. (1957). Origin and distribution of *Saccharum*. *Botanical Gazette* 119: 55-61.
- Naidu, K.M.; Sreenivasan, T.V. (1987). Conservation of sugarcane germplasm. In: *Copersucar International Breeding Workshop*. Piracicaba: Copersucar.
- Narayanaswamy, S. (1940). Megasporogenesis and origin of triploids in *Saccharum*. *Indian Journal of Agricultural Sciences* 10: 534-551.
- Oliveira, K. M. (2006). Desenvolvimento de marcadores moleculares EST-SSRs e mapeamento funcional em cana-de-açúcar (*Saccharum*, spp.). Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas.
- Ometto, J.C. (1981). *Bioclimatologia vegetal*. São Paulo: Agronômica Ceres.

- Ortolan, M.C.A. (2006). Perspectivas para o setor sucroalcooleiro brasileiro. In: Segato, S.V. *et al* (Ed.). *Atualização em produção de cana-de-açúcar*. Piracicaba: Escola Superior Agronomia Luiz de Queiroz/USP.
- Pange, R.R. (1933). *Saccharum spontaneum* L. A comparative study of the forms grown at the imperial Sugarcane Breeding Station, Coimbatore. *Indian Journal of Agriculture Science* 3: 1-10.
- Pange, R.R.; Srinivasan, K. (1957). Studies in *Saccharum spontaneum*. The geographical distribution of spikelet length. *Indian Journal Sugarcane Research & Development* 1: 1-8.
- Parthasarathy, N. (1948). Origin of noble sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). *Nature* 161: 608.
- Pedersen, C.; Zimny, J.; Becker, D.; Jahne-Gartner, A.; Lorz, H. (1997). Localization of introduced genes on the chromosomes of transgenic barley, wheat and triticale by fluorescence in situ hybridization. *Theoretical and Applied Genetics* 94: 749–757.
- Peixoto, T.C. (1988). Genealogia e grau de parentesco de progenitores e progênies. *Boletim Técnico Copersucar* 40: 32-38.
- Piperidis, G.; Christopher, M.J.; Carroll, B.J.; Berding, N.; D'Hont, A. (2000). Molecular contribution to selection of intergeneric hybrids between sugarcane and the wild species *Erianthus arundinaceus*. *Genome* 43: 1033-1037.
- Price S. (1957). Cytological studies in *Saccharum* and allied genera. III. Chromosome numbers in interspecific hybrids. *Botanical Gazette* 118: 146-159.

- Price S. (1961). Cytological studies in *Saccharum* and allied genera VII maternal chromosome transmission by *S. officinarum* in intra and interspecific crosses. *Botanical Gazette* 122: 298-305.
- Price S. (1963). Cytological studies in *Saccharum* and allied genera. VIII. Progenies from 112- and 136- chromosome *S. officinarum* x *S. spontaneum* hybrids. *Botanical Gazette* 124: 186-190.
- Price S. (1963). Cytogenetics of modern sugar canes. *Economic Botany* 17: 97-106.
- Price S. (1965). Interspecific hybridization in sugarcane breeding. *Proceedings of the International Society of Sugar Cane Technologists* 12: 1021-1026.
- Raghavan, T.S.; Govindasamy, S. (1956). Phylogeny of *Saccharum* and related genera. *Proceedings of the International Society of Sugar Cane Technologists* 9: 695-708.
- Rao, J.T. (1987). Sugarcane origin, taxonomy, breeding and varieties. In: (Rao, J.T.) (Ed.). *Sugarcane varietal improvement*. Coimbatore, Índia: ICAR.
- Rao, J.T.; Babu, C.N. (1955). Chromosome numbers in *Saccharum spontaneum* L. *Current Science* 24: 53-54.
- Roach, B.T. (1977). *Saccharum spontaneum*: Utilization of wild germplasm in breeding. *Proceedings of the International Society of Sugar Cane Technologists* 16: 233-238.
- Roach, B.T.; Daniels, J. (1987). A review of the origin and improvement of sugarcane. In: *Copersucar International Sugarcane Breeding Workshop*. Copersucar, Piracicaba, São Paulo 1-31.
- Scarpari, M.S.; Beauclair, E.G.F. (2008). Anatomia e Botânica. In: Dinardo-Miranda, L.L.; Vasconcelos, A.C.M.; Landell, M.G.A. (Ed.). *Cana-de-açúcar*. Ribeirão Preto: IAC.

- Schwarzacher, T.; Heslop-Harrison, J.S. (2000). *Practical in situ Hybridization*. (Oxford, UK: Bios).
- Shripad, R.B.; Gil, S.S. (1985). The implications of 2n egg gametes in nobilization and breeding of sugarcane. *Euphytica* 34: 377-384.
- Silvarolla, M.B.; Aguiar-Perecin, M.L.R. (1994). Evaluation of chromosome number stability in two sugarcane varieties. *Revista Brasileira de Genetica* 17: 237-242.
- Sreenivasan, T.V.; Nair, N.V. (1991). Catalogue on sugarcane genetic resources-III (*Saccharum officinarum* L.). Coimbatore, Índia: ICAR.
- Stevenson, G. C. (1965). *Genetics and Breeding of Sugar Cane*. Longmans, Green and Co, London.
- Subramanian, K. (1987). Morphological descriptors and agriculture characteristics. In: Sankaranarayanan, P.; Natarajan, B.V. (Ed.). *Sugarcane varieties in India*. Coimbatore, Índia: ICAR.
- Sybenga, J. (1992) Cytogenetics in plant breeding. *Monographs on Theoretical and Applied Genetics* 17: 4-5.
- Thompson, G.D. (1976). Water use by sugarcane. *South African Sugar Journal* 60: 627-635.
- Van Dillewijn, C. (1952). *Botany of sugarcane*.
- Wang, C.J.; Chen, C.C. (2005) Cytogenetic mapping in maize. *Cytogenetic and Genome Research* 109: 63-69.

UNICA. União da Indústria da Cana-de-açúcar (Dados e Cotações, 2009). www.unica.com.br.
Acessado em 09/07/2009.

UNICA. União da Indústria da Cana-de-açúcar (Dados e Cotações, 2008). www.unica.com.br.
Acessado em 10/07/2008.

UNICA. União da Indústria da Cana-de-açúcar (Notícias: Retirada dos subsídios, 2005).
www.unica.com.br. Acessado em 14/09/2008.